

FERNANDA DE LACERDA GOMARA

ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DO ÁCIDO KÓJICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientador: Prof.^a. Dr.^a. Mayumi Eliza O Sato

CURITIBA

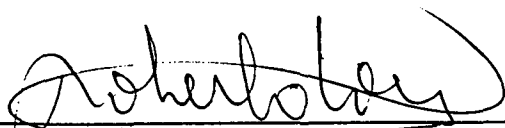
2003

PARECER

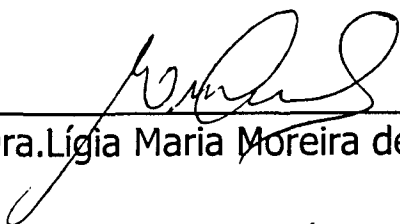
A Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para julgar e avaliar a dissertação de mestrado "Estudo de permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico", de autoria da pós-graduanda FERNANDA DE LACERDA GOMARA, composta pelos Professores Dr. Roberto Pontarolo (Orientador/Presidente) Dra. Lígia Maria Moreira de Campos (Universidade Federal de Minas Gerais) e o Titular Cid Aimbiré de Moraes Santos (Universidade federal do Paraná).

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 9.3, conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

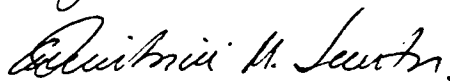
Curitiba, 27 de junho de 2003.



Prof. Dr. Roberto Pontarolo (Orientador/Presidente)



Profª Dra. Lígia Maria Moreira de Campos - UFMG



Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos - UFPR

**Dedico este trabalho aos meus pais
Francisco José de Lacerda Gomara e
Leslie Suzete Caron de Lacerda
Gomara, responsáveis pela realização
de todos os meus sonhos.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo e cuidado a mim dedicado.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pela orientação, estímulo, amizade e confiança em mim depositada.

À Prof^a. Dr^a. Mayumi Elisa Otsuka Sato, pela amizade, paciência e participação no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Itamar Francisco Andreazza pelo estímulo ao estudo e à pesquisa e as suas valiosas colaborações, que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, UFPR, que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo empréstimo de materiais indispensáveis à execução deste trabalho.

À Prof. Dr^a. Iara Maria Pereira Machado, pela colaboração na execução das fotos.

À Valeska Pereira, pela participação ativa no decorrer do trabalho.

Ao matadouro Basso, pela doação das orelhas de porco utilizadas neste trabalho.

À toda minha família pela presença constante e incentivo sempre.

Ao Emerson pela compreensão, amizade, dedicação, carinho e por me fazer sempre acreditar que os sonhos podem se tornar realidade.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 A PELE	4
3.1.1 Anatomia	4
3.1.1.1 Epiderme	5
3.1.1.2 Derme	5
3.1.2 Funções da Pele	6
3.1.2.1 Funções gerais	6
3.1.2.2 Funções específicas	7
3.1.2.2.1 Função melanogênica	7
3.1.2.2.1.1 Melanina	7
3.1.2.2.1.2 Funções da melanina	9
3.1.2.2.1.3 Origem da melanina	10
3.1.2.2.1.4 Síntese da melanina	10
3.2 HIPERPIGMENTAÇÃO	14
3.2.1 Classificação das Hiperpigmentações	15
3.2.1.1 Melasma ou cloasma	15
3.2.1.2 Sardas ou efélides	16
3.2.1.3 Lentigens	16
3.2.1.4 Lentigens actíneas	16
3.2.1.5 Lentigens senis ou de luz solar	17
3.2.1.6 Melanoses por fotossensibilizantes	17
3.2.1.7 Melanoses tóxico- medicamentosas	18
3.2.1.8 Melanose pós-inflamatória ou melanodermias residuais	18
3.2.1.9 Nevus	19
3.3. DESPIGMENTANTES	19
3.3.1 Conceito	19
3.3.2 Classificação	19

3.3.3 Agentes Clareadores	19
3.3.3.1 Ácido kójico	19
3.3.3.2 Ácido glicólico	21
3.3.3.3 Ácido retinóico	21
3.3.3.4 Hidroquinona	22
3.3.3.5 Ácido ascórbico	23
3.3.3.6 Arbutina	23
3.3.3.7 Melawhite®	24
3.3.3.8 VC- PMG®	24
3.3.3.9 Antipollon HT®	24
3.3.3.10 Ácido azelaico	25
3.3.3.11 Extratos vegetais	25
3.3.3.12 Melfade®	25
3.3.3.13 Ácido fítico	26
3.4 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS	26
3.4.1 Emulsões	27
3.5 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	34
3.5.1 Terminologias	34
3.5.2 Aparelhos Utilizados nos Testes <i>in vitro</i>	35
3.5.3 Membranas Utilizadas nos Testes <i>in vitro</i>	39
3.5.4 Soluções Receptoras Utilizadas nos Testes <i>in vitro</i>	43
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	45
3.6.1 Exatidão	46
3.6.2 Precisão	47
3.6.3 Especificidade	47
3.6.4 Limite de Detecção	48
3.6.5 Limite de Quantificação	48
3.6.6 Linearidade e Faixa de Trabalho	48
3.6.7 Robustez	49
3.6.8 Sensibilidade	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 MATERIAL	50
4.1.1 Matéria-Prima e Reagentes	50
4.1.2 Equipamentos	50
4.2 MÉTODOS	51
4.2.1 Desenvolvimento de Forma Farmacêutica	51
4.2.2 Avaliação das Características Organolépticas dos Veículos	52
4.2.3 Avaliação Preliminar da Estabilidade da Formulação Escolhida	52

4.2.4 Espectrofotometria no Ultravioleta	53
4.2.4.1 Curva padrão ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta.....	53
4.2.4.2 Linearidade	53
4.2.4.3 Robustez	54
4.2.4.3.1 Influência do pH.....	54
4.2.4.3.2 Influência do tempo de leitura	55
4.2.4.3.3 Influência da temperatura	56
4.2.4.4 Exatidão	56
4.2.4.5 Precisão	56
4.2.5 Espectrofotometria no Visível pelo Cloreto Férrico	57
4.2.5.1 Determinação da influência da concentração de cloreto férrico na intensidade de cor na solução com ácido kójico.....	57
4.2.5.2 Espectro de absorção do ácido kójico em presença de cloreto férrico	58
4.2.5.3 Curva padrão do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico	58
4.2.5.4 Linearidade	59
4.2.5.5 Robustez	59
4.2.5.5.1 Influência do pH	60
4.2.5.5.2 Influência do tempo de leitura	60
4.2.5.5.3 Influência da temperatura	60
4.2.5.6 Exatidão	61
4.2.5.7 Precisão	61
4.2.6 Avaliação da Qualidade da Matéria-Prima.....	62
4.2.7 Avaliação da Qualidade da Formulação	63
4.2.8 Permeação Cutânea <i>In Vitro</i> do Ácido Kójico	63
4.2.8.1 Célula de difusão	63
4.2.8.2 Membrana	64
4.2.8.3 Ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> do ácido kójico na formulação	65
4.2.8.4 Ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> do ácido kójico em solução tampão fosfato pH 7,4	66
4.2.9 Determinação da quantidade de ácido kójico retido na pele da orelha de porco	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 OBTENÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA	68
5.1.1 Emulsão	68
5.1.2 Avaliação das Características Organolépticas das Formulações Prévias	70
5.1.3 Avaliação Preliminar da Estabilidade da Formulação F 4	72
5.2 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA	73
5.2.1 Curva Padrão do Ácido Kójico por Espectrofotometria no Ultravioleta.....	74
5.2.2 Sensibilidade.....	75

5.2.3 Linearidade	75
5.2.4 Robustez	76
5.2.4.1 Influência do pH	77
5.2.4.2 Influência do tempo de leitura	80
5.2.4.3 Influência da temperatura	80
5.2.5 Exatidão	81
5.2.6 Precisão	83
5.3 ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	84
5.3.1 Determinação da Influência da Concentração de Cloreto Férrico na Intensidade de Cor na Solução com Ácido Kójico	86
5.3.2 Curva Padrão do Ácido Kójico por Espectrofotometria no visível pelo Cloreto Férrico	88
5.3.3 Sensibilidade	89
5.3.4 Linearidade	89
5.3.5 Robustez	90
5.3.5.1 Influência do pH	90
5.3.5.2 Influência do tempo de leitura	91
5.3.5.3 Influência da temperatura	92
5.3.6 Exatidão	93
5.3.7 Precisão	94
5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DOSEAMENTO DO ÁCIDO KÓJICO	95
5.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA	96
5.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA FORMULAÇÃO	99
5.7 PERMEAÇÃO CUTÂNEA	99
5.8 RETENÇÃO CUTÂNEA	107
6 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	113
ANEXOS	124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- ELEMENTOS NECESSÁRIOS PARA VALIDAÇÃO	46
TABELA 2	- FORMULA DAS EMULSÕES O/A NÃO IÔNICAS.....	52
TABELA 3	- OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE ÁCIDO KÓJICO 20 µg/ml EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	54
TABELA 4	- SOLUÇÕES TAMPÃO	55
TABELA 5	- SISTEMAS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO FÉRRICO NA INTENSIDADE DE COR NA SOLUÇÃO COM ÁCIDO KÓJICO	57
TABELA 6	- PREPARO DOS SISTEMAS PARA OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO DO ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	59
TABELA 7	- PREPARO DOS SISTEMAS PARA VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO pH NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	60
TABELA 8	- PREPARO DOS SISTEMAS PARA DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO COM CLORETO FÉRRICO	62
TABELA 9	- CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DAS FORMULAÇÕES PRÉVIAS	71
TABELA 10	- FORMULAÇÃO	72
TABELA 11	- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO F 4	72
TABELA 12	- VALORES DE ABSORVÂNCIA OBTIDOS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE ÁCIDO KÓJICO	74
TABELA 13	- VALORES DE ABSORVÂNCIA E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO TESTE DE EXATIDÃO	83
TABELA 14	- VALORES DE ABSORVÂNCIA OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO INTRA-DIA	83
TABELA 15	- VALORES DE ABSORVÂNCIA OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO INTER-DIAS	84
TABELA 16	- VALORES DE ABSORVÂNCIA DE SISTEMAS CONTENDO 100 µg DE ÁCIDO KÓJICO PADRÃO E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO FÉRRICO	87
TABELA 17	- VALORES DE ABSORVÂNCIA E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO TETE DE EXATIDÃO	94
TABELA 18	- VALORES DE ABSORVÂNCIA OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO INTRA-DIA	94
TABELA 19	- VALORES DE ABSORVÂNCIA OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO	

INTER-DIAS	954
TABELA 20 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DOSEAMENTO DO ÁCIDO KÓJICO	96
TABELA 21 - PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA A MATÉRIA-PRIMA.....	97
TABELA 22 - PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA A FORMULAÇÃO F 4	99
TABELA 23 - RESULTADOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO KÓJICO ATRAVÉS DA PELE DA ORELHA DE PORCO	103
TABELA 24 - PARÂMETROS CINÉTICOS DAS CURVAS DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO KÓJICO NAS FORMULAÇÕES EM ESTUDO.....	106
TABELA 25 - RETENÇÃO CUTÂNEA DO ÁCIDO KÓJICO DA FORMULAÇÃO F 4	108
TABELA 26 -RETENÇÃO CUTÂNEA DO ÁCIDO KÓJICO DA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO ISOTÔNICA pH 7,4.....	108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- A PELE E SEUS APÊNDICES	4
FIGURA 2	- POSSÍVEIS ROTAS DE PENETRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PELA MEMBRANA DO ESTRATO CÓRNEO	7
FIGURA 3	ETAPAS QUÍMICAS E RESPECTIVOS REGULADORES ENVOLVIDOS NA VIA MELANOGENICA	12
FIGURA 4	- ESTRUTURA DO ÁCIDO KÓJICO	20
FIGURA 5	- MODELOS DE CÉLULAS DE DIFUSÃO PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E/OU PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS CONTIDOS EM PRODUTOS DERMATOLÓGICOS	36
FIGURA 6	- CÉLULA DE DIFUSÃO UTILIZADA NO PRESENTE TRABALHO	64
FIGURA 7	- DISSECAÇÃO DA PELE DA ORELHA DE PORCO	65
FIGURA 8	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO PADRÃO 25 µg/ml EM ÁGUA (pH 6,0)	73
FIGURA 9	- CURVA PADRÃO DE ÁCIDO KÓJICO OBTIDA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA	75
FIGURA 10	- DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA.....	76
FIGURA 11	- INFLUÊNCIA DO pH NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA	77
FIGURA 12	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO KÓJICO 25 µg/ml EM TAMPÃO H ₃ BO ₃ .KCl - NaOH (pH 9,0)	78
FIGURA 13	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO 25 µg/ml EM TAMPÃO ACETATO (pH 3,0)	79
FIGURA 14	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO KÓJICO 25 µg/ml EM ÁGUA (pH 6,0)	79
FIGURA 15	- INFLUÊNCIA DO TEMPO DE LEITURA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA	80
FIGURA 16	- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA	81
FIGURA 17	- ESTRUTURA DO P-HIDROXI-METILPARABENO	82
FIGURA 18	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO AQUOSA DE METILPARABENO 25 µg/ml	82
FIGURA 19	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO (25 µg/ml) POR	

	ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	85
FIGURA 20	- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO CONSERVANTE METILPARABENO (NIPAGIN [®]) POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	86
FIGURA 21	- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MAIS ADEQUADA DE CLORETO FÉRRICO PARA OS SISTEMAS	88
FIGURA 22	- CURVA PADRÃO DO ÁCIDO KÓJICO OBTIDA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	89
FIGURA 23	- DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DO ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	90
FIGURA 24	- INFLUÊNCIA DO pH NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	91
FIGURA 25	- INFLUÊNCIA DO TEMPO DE LEITURA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	92
FIGURA 26	- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO KÓJICO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO	93
FIGURA 27	- ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO KÓJICO PADRÃO E DA MATÉRIA-PRIMA	98
FIGURA 28	- ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DO ÁCIDO KÓJICO PADRÃO E DA MATÉRIA-PRIMA	98
FIGURA 29	- CURVA PADRÃO DO ÁCIDO KÓJICO EM SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4	102
FIGURA 30	- PERFIL DOS FLUXOS DE PERMEAÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO ATRAVÉS DA PELE DA ORELHA DE PORCO	104
FIGURA 31	- DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE LATÊNCIA DA PERMEAÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO NAS FORMULAÇÕES	105
FIGURA 32	- CURVA PADRÃO DO ÁCIDO KÓJICO EM METANOL	107
FIGURA 33	- QUANTIDADE DE ÁCIDO KÓJICO RETIDO NA PELE DA ORELHA DE PORCO APÓS OITO HORAS DE CONTATO COM OS VEÍCULOS	109

A	- absorvância
ACTH	- hormônio adrenocorticotrópico
A/O	- água em óleo
BHT	- butilhidroxitolueno
BPF	- boas práticas de fabricação
DHI	- 5, 6 – dihidroxiindol
DHICA	- 5, 6 – dihidroxiindol – 2 – ácido carboxílico
DOPA	- 3, 4 – diidroxifenilalanina
DPR	- desvio padrão relativo
EDTA – Na₂	- ácido etilenodiaminotetracético dissódico
F. BRAS. IV	- Farmacopéia Brasileira 4 ^a . edição
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HLB	- equilíbrio hidrófilo-lipófilo
MSH	- hormônio melano estimulante
O/A	- óleo em água
%	- porcentagem
r	- coeficiente de correlação
rpm	- rotações por minuto
TRP	- <i>tyrosine – related – protein</i>
SD	- desvio padrão
USP	- <i>United States Pharmacopoeia</i>
UV	- ultravioleta

RESUMO

Desordens no processo melanogênico podem causar as hiperpigmentações, sendo a de maior frequência o melasma. O ácido kójico é um dos despigmentantes tópicos utilizados no tratamento destas hiperpigmentações. A ação de um produto dermatológico deve ser tópica, não devendo atingir níveis sistêmicos. Um dos fatores que pode definir o nível de ação, tópica ou sistêmica, é o veículo. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o grau de permeação cutânea *in vitro*, célula de FRANZ modificada, de uma formulação em relação a uma solução tampão pH 7,4, ambas contendo ácido kójico. A primeira parte do trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de duas metodologias para a quantificação do ácido kójico na matéria-prima e na formulação. Tanto o método espectrofotométrico no ultravioleta quanto o método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico apresentaram os parâmetros de validação (sensibilidade, faixa de linearidade, robustez, exatidão e precisão) satisfatórios, sendo o primeiro é mais sensível e por isso o mais adequado para o estudo de permeação, embora o método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico tenha se mostrado mais adequado para a determinação do teor de ácido kójico na formulação. O estudo *in vitro* mostrou que a absorção do ácido kójico da formulação apresentou cinética de pseudo 1ª ordem (no intervalo de 1 a 8 horas) e conseqüentemente menor fluxo através da membrana natural (pele da orelha de porco) e maior retenção cutânea, enquanto que o ácido kójico da solução tampão pH 7,4 apresentou cinética de ordem zero e conseqüentemente maior fluxo e menor retenção. Este resultado indicou que a formulação desenvolvida mostrou-se adequada para a veiculação do ácido kójico, tendo em vista, que o órgão alvo é a pele.

ABSTRACT

Disorder of the tirosinase biosynthesis process can result on hiperpigmentations, like the frequently found melasma. The kojic acid is one of the depigmenting topic agent utilized in the handling of these hiperchromies. The action of a dermatologic product o should be topic, should not reach systemic levels. One of the factors that is able to defined the level of action, topic or systemic, is the vehicle. In this contest, the present work had for objective evaluate the rank of *in vitro* cutaneous permeation, in the cell of FRANZ modified, of a formulation regarding a buffered solution 7,4, both containing kojic acid. The first part of the work consisted of the development and validation of two methodologies for the quantification of the kojic acid in the raw material and in the formulation. Both methods, the spectrophotometric in the ultraviolet and the spectrophotometric the visible, presented the parameters of validation (sensibility, streak of linearity, robustness, accuracy and precision) satisfactory, being the first one more sensible and by that the most adequate for the permeation study, although the spectrophotometric method in the visible have shown adequate for the determination of the content. The *in vitro* study showed that the absorption of kojic acid from the formulation presented kinetic of pseudo 1st. order (in the break from 1 to 8 hours) and consequently smaller stream through the natural membrane (skin from the ear of pig) and bigger cutaneous retention, while the kojic acid from the buffered solution pH 7,4 presented kinetic of zero order and consequently bigger stream and smaller retention. This result indicated that the formulation developed can be used like vehicle of kojic acid, having in mind that the organ aim is the skin.

1 INTRODUÇÃO

Em um mundo cada vez mais globalizado e competitivo, a aparência física tornou-se um aspecto de grande importância na sociedade contemporânea.

As manchas da pele, principalmente as faciais, são inestéticas e causam alguns transtornos que dificultam o bem-estar do indivíduo no âmbito psicossocial.

As hiperpigmentações são, em geral, distúrbios caracterizados pelo aumento de melanina e outros pigmentantes na pele. Os principais desencadeadores são as radiações solares, os hormônios sexuais e agentes externos, fontes de radicais livres.

Neste contexto, tanto as indústrias de cosméticos quanto farmacêuticas têm crescido a cada ano, diversificando suas matérias-primas e ampliando suas linhas de produtos disponíveis ao consumidor.

Atualmente a Tecnologia Farmacêutica tem dado especial atenção à avaliação da eficácia terapêutica do produto acabado. Um produto estável e com dosagem correta, pode proporcionar uma ação medicamentosa inadequada. Vários fatores podem ser responsáveis por esta falha na atividade do produto, como por exemplo, os fatores fisiológicos, os quais dependem, na maioria das vezes, do paciente ou do substrato biológico da medicação. Nesta situação, o farmacêutico formulador não possui condições de atuar diretamente. Entretanto, existem vários fatores inerentes ao próprio fármaco, à forma farmacêutica, à formulação e ao processo tecnológico de fabricação, que influem, quase sempre de forma direta e expressiva, na disponibilidade dos medicamentos. Nestes casos, o papel do formulador é fundamental e sua responsabilidade indeclinável.

A determinação, a interpretação e a modulação da biodisponibilidade dos medicamentos, através de suas formulações, constituem os principais objetivos de uma ciência galênica denominada Biofarmácia, que é extremamente difundida e praticada por pesquisadores farmacotécnicos. A prática da biofarmácia requer, como conhecimento fundamental, uma formação farmacocinética básica, um conhecimento profundo dos mecanismos de liberação e absorção dos fármacos, bem como da modificação destes processos mediante meios físico-químicos e tecnológicos.

Nos produtos dermatológicos, a formulação que contém o princípio ativo influencia de maneira significativa na ação final do medicamento. Isto porque, várias interações entre princípio(s) ativo(s) e veículo(s) são estabelecidas, interações estas, que podem modificar, por exemplo, o coeficiente de partição do(s) fármaco(s) entre o veículo e a pele. Podem, também, alterar a integridade do estrato córneo e, nesta situação, a solubilidade do fármaco na camada córnea e/ou a facilidade com que ele se difunde através deste tecido, encontram-se afetadas.

A absorção de princípios ativos na pele envolve dois passos consecutivos: a liberação dessa substância pelo veículo e sua subsequente absorção cutânea. Os princípios ativos incorporados em veículos inadequados podem ser pouco ou nada absorvidos pela pele. Com base neste fato, pode-se considerar que os estudos de liberação medicamentosa proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os componentes ativos (CHOWHAN, PRITCHARD, 1975).

As características de liberação de um fármaco a partir de um veículo dermatológico podem ser avaliadas determinando-se o coeficiente de partição óleo/água. Entretanto, estudos de liberação *in vitro* e *in vivo* proporcionam dados mais significativos. Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é adequado empregar procedimentos de liberação *in vitro* para selecionar veículos que possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada.

Inúmeros são os veículos e adjuvantes empregados em dermatologia, porém, a tendência atual é desenvolver bases dermatológicas que funcionem como sistemas adequados de liberação de fármacos, associados a alteradores de permeabilidade cutânea, que sejam biocompatíveis com as membranas celulares (BAE, KIM, 1993).

Com base nas colocações acima e na importância das substâncias despigmentantes em dermatologia, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia para o doseamento do ácido kójico, validá-la e desenvolver uma preparação dermatológica adequada para veiculação desse fármaco, fazendo uso de metodologia *in vitro* para avaliação da liberação e penetração transcutânea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a absorção percutânea *in vitro* do ácido kójico, despigmentante, em uma forma farmacêutica semi-sólida de uso tópico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma forma farmacêutica, estável, do tipo emulsão para veicular o ácido kójico.
- Desenvolver e validar um método de doseamento para o ácido kójico.
- Determinar o teor de ácido kójico na matéria-prima e na forma farmacêutica utilizada como veículo.
- Determinar o grau de absorção percutânea *in vitro* do ácido kójico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A PELE

3.1.1 Anatomia

A pele é o maior órgão do corpo humano, sua superfície total oscila entre 2500 cm² em um recém-nascido a 18000 cm² em um adulto e pesa aproximadamente 4,8 kg em um homem. Em cada centímetro quadrado podem ser encontrados 10 folículos pilosos, 100 glândulas sudoríparas, 15 glândulas sebáceas, três vasos sanguíneos, 360 cm de nervos e 3 X 10⁶ células (BARRY, 1983).

A pele é composta por diferentes tecidos, mas que são interdependentes: a epiderme pluricelular, estratificada e avascular, e a derme de tecido conectivo. A hipoderme, uma camada adiposa subcutânea, encontra-se abaixo da derme (Figura 1).

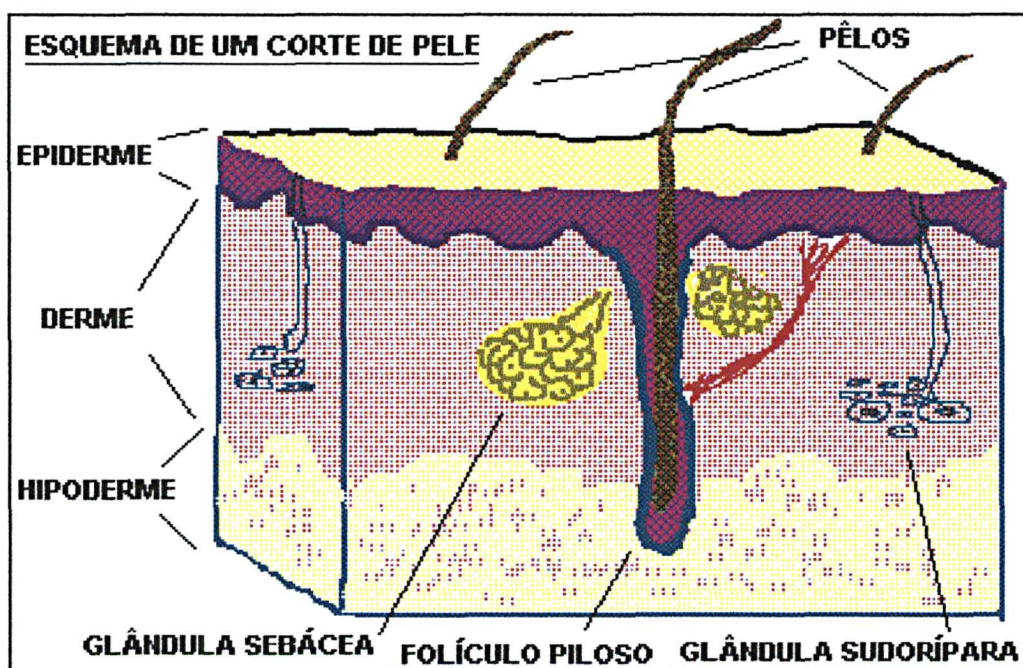


Figura 1: A pele e seus apêndices (BARRY, 1983).

3.1.1.1 Epiderme

A epiderme consta de várias camadas. A estratificação é resultado da produção de queratinócitos pela camada basal fazendo com que as células mais antigas migrem à superfície e se desprendam. A espessura da epiderme varia de acordo com a região do corpo, sendo mais espessa nas palmas das mãos e planta dos pés e mais fina ao redor dos olhos.

As camadas formadas são:

- Camada basal: localiza-se na junção dermo-epidermal. É uma camada unicelular que dá origem a todos os queratinócitos por mitose para renovação da epiderme. Entre estas células estão presentes os melanócitos, células responsáveis pela produção de pigmentos da pele.
- Camada espinhosa: tem-se nesta camada 6 a 20 fileiras de queratinócitos em forma globulosa, poliédricas e aderidas entre si por espessamento da membrana (desmossomas) dando-lhe a aparência espinhosa.
- Camada granulosa: são 3 a 4 fileiras de queratinócitos achatados com núcleo basófilo e protoplasma contendo granulações de queratohialina. As células estão perdendo as características vitais.
- Camada lúcida: está presente nas palmas das mãos e nas plantas dos pés. São regiões pobres em hialina, formando uma fina e translúcida linha logo acima da camada granulosa.
- Estrato córneo: composto por várias camadas de células achatadas mortas que contêm pequenas bolsas de queratina. Constituem a camada mais superficial da epiderme. É recoberta pela emulsão fisiológica epicutânea e encontra-se em constante processo de desprendimento.

Representa uma região importante no controle da absorção de fármacos. A permeabilidade seletiva desta estrutura é o fator principal de muitos aspectos biofarmacêuticos de medicamentos tópicos. É nesta camada que algumas substâncias podem ficar depositadas e não atingirem a derme (ROUGIER et al., 1983).

3.1.1.2 Derme

A derme é uma camada mais espessa que a epiderme. Sua principal constituição é uma matriz de tecido conectivo formado por proteínas (75% de

colágeno, 4 % de elastina e 0,4 % de reticulina) envolvidas em mucopolissacarídeo. Na derme são encontrados vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e os apêndices cutâneos (glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e unhas).

3.1.2 Funções

A pele, como órgão, desempenha diversas funções, algumas gerais e outras específicas (BARRY, 1983).

3.1.2.1 Funções gerais

As funções gerais são descritas a seguir.

- a) Função barreira: proteger contra a entrada de microorganismos, substâncias químicas, radiação, calor e choque mecânico.
- b) Função de percepção: receber estímulos externos, como o tato, calor e dor.
- c) Função termorreguladora.
- d) Função de sintetizar e metabolizar substâncias.
- e) Função secretora: suor, sebo, hormônios.
- f) Função reguladora da pressão sanguínea.

No desenvolvimento de produtos dermatológicos, a função barreira é a que mais merece atenção, porque várias substâncias medicamentosas são veiculadas no local. A pele regula a entrada destas substâncias externas no organismo. A entrada de fármacos pela pele pode ocorrer das três maneiras descritas a seguir (BARRY, 1983).

- Via transepidérmica intracelular.
- Via transepidérmica intercelular.
- Via apêndices: folículos pilosos, glândulas sebáceas e poros.

Para o fármaco penetrar na pele é necessário que ocorra primeiro a difusão e liberação do veículo, bem como sua partição nas diversas camadas da pele. A Figura 2 mostra, esquematicamente, as rotas de penetração de substâncias utilizadas em dermatologia (BARRY, 1983; RIEGER, 2000).

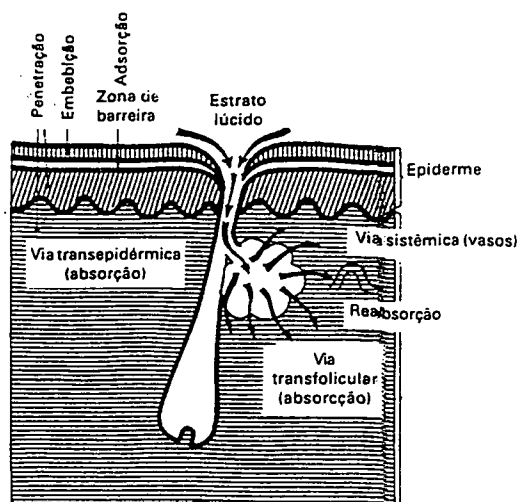


Figura 2: Representação esquemática da membrana do estrato córneo, ilustrando as possíveis rotas de penetração de substâncias (RIEGER, 2000).

3.1.2.2 Funções específicas

As funções específicas da pele são, por sua vez, as seguintes.

- a) Sudoral: produção do suor.
- b) Sebácea: produção de sebo.
- c) Queratogênica; produção de queratinócitos.
- d) Melanogênica: produção de melanina.

Para compreender a ação de substâncias despigmentantes é necessário conhecer, principalmente, a função melanogênica.

3.1.2.2.1 Função melanogênica

Ainda que a cor da pele dependa da hemoglobina dos vasos sanguíneos e dos carotenóides amarelos da gordura hipodérmica, o principal determinante é a melanina.

3.1.2.2.1.1 Melanina

A melanina é um termo genérico para descrever grupo de biopolímeros heterogêneos, pigmentados, polifenólicos de alto peso molecular. As melaninas

possuem origem, composição química e propriedades físicas diversas, apesar de possuírem precursores semelhantes (DAMONTE et al., 1995). São encontradas em praticamente todos os tecidos vivos na forma insolúvel (PEREIRA, 1993).

Nos seres humanos a melanina é produzida por células dendríticas especializadas, os melanócitos, e é responsável pela coloração da pele, cabelos e olhos (PENTAFARMA, 1997a).

A melanina é capaz de absorver a luz visível e ultravioleta (UV), protegendo a pele de danos provocados por elas (PAWELEK et al., 1992). As principais radiações emitidas pelo sol na região do ultravioleta são: UVC (200 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm) e UVA (320 – 400 nm). As radiações UVA provocam um bronzeado efêmero, pois penetram mais profundamente na derme, sendo responsáveis pela pigmentação direta a partir de um precursor da melanina. As radiações UVB apresentam menor penetração na pele do que as UVA, elas são denominadas eritematosas e promovem a pigmentação indireta e um bronzeado duradouro (ORTONE, 1990). A grande parte das radiações UVC são absorvidas pela camada de ozônio.

Na atualidade sabe-se que as radiações ultravioletas podem acelerar o processo de envelhecimento cutâneo e causar câncer de pele.

A melanina é classificada em eumelanina, feomelanina e citocromos.

EUMELANINA

A eumelanina é um biopolímero com estrutura indol, produzido pela copolimerização da dopa-oxidase e de seus produtos de ciclização, principalmente 5,6-dihidroxiindol e 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA), ou seja, é uma substância resultante da polimerização oxidativa de compostos indólicos derivados da dihidroxifenilalanina (DOPA) (DAMONTE, 1995; VIGLIOGLIA, 1989). É um pigmento insolúvel, de coloração variando de marrom a preto, contendo pequena quantidade de enxofre.

FEOMELANINA

É um pigmento heterogêneo sintetizado a partir de tirosina e cisteína, resultante da polimerização da cistenildopa e produtos de ciclização, particularmente

1,4-benzotiazina (DAMONTE, 1995; VIGLIOGLIA, 1989). Apresenta coloração variável de amarelo a marrom avermelhado e é facilmente degradada pela radiação UV, sendo menos fotoestável do que a eumelanina (NORDLUND et al., 1989).

CITOCROMOS

Os citocromos são constituídos por unidades de benzotiazinas, pertencentes ao grupo das feomelaninas e são encontrados nos cabelos ruivos (VIGLIOGLIA, 1989).

A diferente tonalidade de cores que ocorrem na natureza é explicada pelo fato que raramente a eumelanina e a feomelanina são encontradas na forma isolada. Durante a melanogênese formam-se ambas as melaninas em diferentes proporções (HUNT et al., 1995; OZEKI, ITO, WAKAMATSU, 1996).

Além destes tipos de melaninas, CHEDEKEL e ZEISE (1996) citam outros como as alomelaninas, presentes em fungos, bactérias e plantas; e a neuromelanina presente em neurônios de núcleos cerebrais como, por exemplo, a substância nigra.

3.1.2.2.1.2 Funções da melanina

A principal função da melanina é a proteção solar do genoma celular contra os efeitos nocivos da radiação UV. Também é responsável pela neutralização de radicais livres e superóxidos (DAMONTE, 1995; ITO, CRIPPA, 1985; PEREIRA, 1997; SEARLY et al., 1980), termorregulação em alguns animais, proteção contra afecções actínicas, prevenção do câncer de pele, minimização do impacto de radiações solares e regulação da síntese de vitamina D (CHARLET, 1996).

A maior incidência de câncer em pessoas de pele clara pode ser explicado por estes indivíduos possuírem baixo conteúdo melânico na superfície cutânea, ou seja, pouca melanina atuando como filtro solar (STEINER, 1996).

3.1.2.2.1.3 Origem embriológica da melanina

A melanina é produzida em células especializadas chamadas de melanócitos.

Os melanócitos são células dendríticas (STEINER, 1996), encontradas em todos os mamíferos (PENTAFARMA, 1997b). Originam-se da crista neural como precursores não diferenciados, melanoblastos, de onde migram no 21º. dia da

embriogênese para diferentes partes do organismo (ERICKSON, 1993; PROTA, 1996). São observados na pele, bulbo capilar, sistema nervoso central, globo ocular (trato uveal e retina), na cóclea e sistema vestibular do ouvido interno, sendo que estas últimas três retêm a melanina por toda a vida (NORDLUND et al., 1989; PEREIRA, 1997; PROTA, 1996).

Os melanócitos localizados na camada basal da epiderme e folículo pilo-sebáceo produzem e secretam, continuamente, a melanina para os queratinócitos (STEINER, 1996b). Esta atividade é diminuída com o envelhecimento do indivíduo (VIGLIOGLIA, 1989).

Na camada basal da epiderme, o número de melanócitos varia de 2000 a 2500 por mm² nas regiões expostas à luz e genitais e no resto do corpo de 1000 a 1500 por mm² (QUIROGA, GUILLOT, 1986).

Os melanócitos constituem 5 a 10% do total da população celular da epiderme (STEINER, 1996b). Junto com os queratinócitos e células de Langerhans formam a unidade melanocitária (PAWELEK et al., 1992); geralmente a unidade epidérmica da melanina é constituída por trinta e seis queratinócitos para um melanócito (ELLIS, TAN, ELLIS, 1995; STEINER, 1996b).

3.1.2.2.1.4 Síntese da melanina

A síntese da melanina nos melanócitos é realizada em organelas denominadas melanossomos a partir de um precursor comum, a tirosina (MASUDA, SUZUKI, 1996; PEREIRA, 1997). A síntese melânica é estimulada principalmente pela radiação UV.

A melanogênese envolve diversos passos, sendo regulada pela enzima tirosinase e por uma família de enzimas relacionadas a tirosinase como a TRP-1 ("tyrosine-related-protein-1") ou DHICA oxidase (5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico oxidase) e a TRP-2 ("tyrosine-related-protein-2") ou dopacromo tautomerase (BERND et al., 1994). Além destas enzimas, fatores não enzimáticos interferem na síntese do pigmento, tais como pH, concentrações de tióis e íons metálicos (PEREIRA, 1997) ou oligoelementos como, por exemplo, o cálcio (NORDLUND et al., 1996).

A síntese da melanina é uma reação enzimática oxidativa que ocorre em aerobiose (QUIROGA, 1986).

O início da síntese ocorre com a hidroxilação da tirosina a DOPA (3,4 - dihidroxifenilalanina), etapa lenta em pH igual ou superior a 6,8. Há evidências de que em pH abaixo deste valor a reação é muito mais rápida (NORDLUND et al., 1996). Em seguida a DOPA é oxidada a dopaquinona. A tirosinase participa de ambas reações. Após estas etapas a via pode seguir dois caminhos distintos em função do tipo de melanina a ser formada.

Na síntese da eumelanina, a dopaquinona sofre uma rápida ciclização a leucoDOPAcromo (PROTA, 1996) e oxidação espontânea a dopacromo que pode sofrer descarboxilação espontânea ou ser rearranjado pela dopacromo tautomerase (TRP-2) (BERND et al., 1994) gerando dois monômeros altamente reativos, o DHl (5,6-dihidroxiindol) e o DHICA (5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico). O primeiro se polimeriza com auxílio da tirosinase e o segundo da DHICA oxidase (TRP-1), levando ambas reações à formação da eumelanina. Uma maior proporção de DHICA produz uma eumelanina marrom clara solúvel, ao invés da marrom escura insolúvel (PEREIRA, 1997) (Figura 3).

A produção da feomelanina ocorre, não enzimaticamente, devido à combinação da dopaquinona com compostos sulfídricos, cisteína e glutatona, levando à formação de cistenildopa. Esta, por oxidação espontânea, dá origem a derivados da benzotiazina que se polimerizam formando o pigmento (PEREIRA, 1997; VIGLIOGLIA, 1989) (Figura 3).

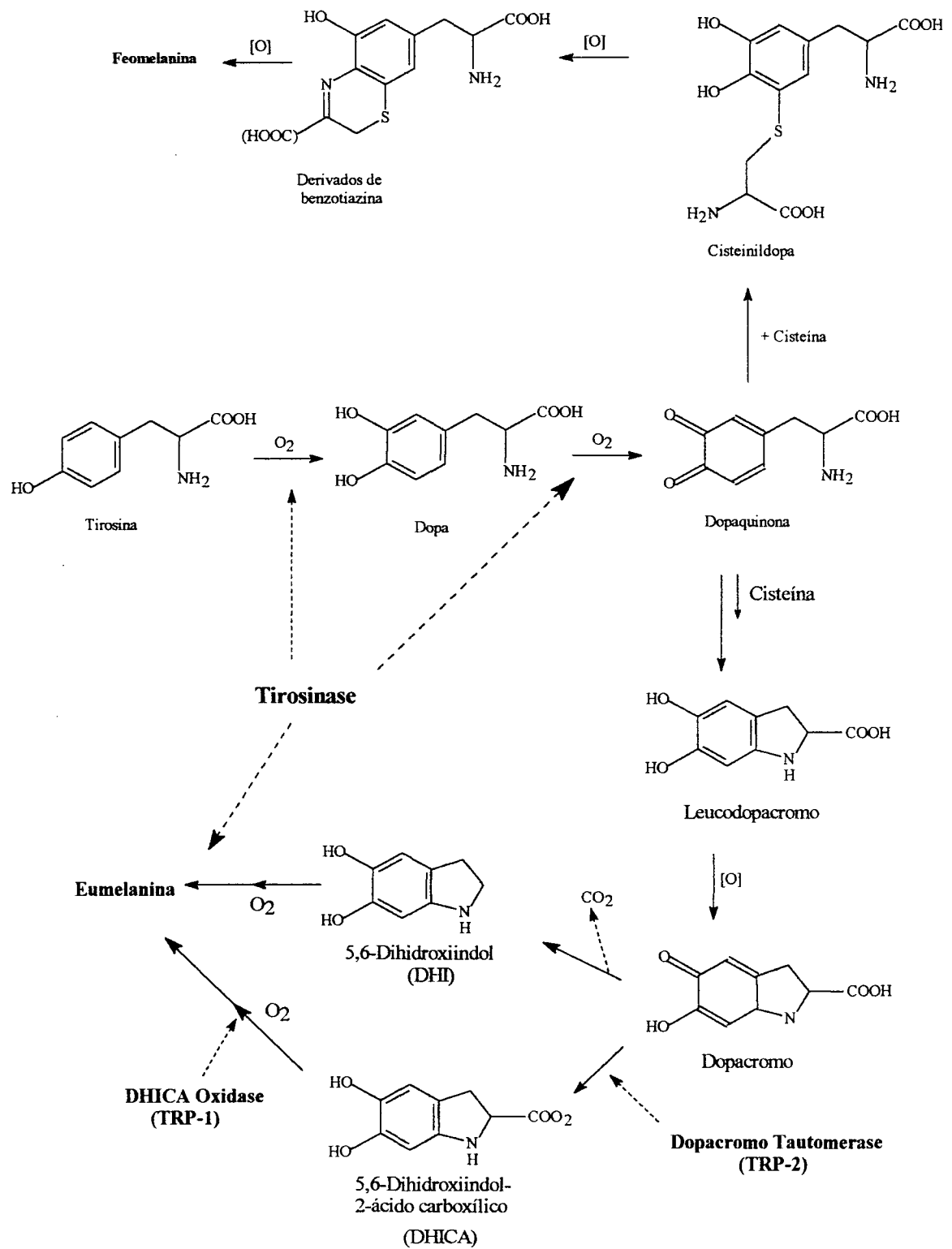


Figura 3: Etapas químicas e respectivos reguladores envolvidos na via melanogênica (OZEKI, ITO, WAKAMATSU, 1996).

A tirosinase é uma cuproproteína que contém uma fração glicídica (ácido neurâmico e galactose) que controla o processo melanogênico (VIGLIOGLIA, 1989). É sintetizada na superfície do retículo endoplasmático rugoso e depois transferida para o complexo de Golgi associada com o lisossomo, onde é ativada pela adição de uma cadeia de açúcar, antes de ser secretada em vesículas. Um pré-melanossomo liberado do complexo de Golgi funde-se com a vesícula para formar o melanossomo (NORDLUND et al., 1996).

Os melanócitos geralmente transferem os melanossomos para os queratinócitos que recebem estas organelas de forma ativa (STEINER, 1996), onde serão metabolizadas durante o processo de queratinização (MASUDA, SUZUKI, 1996), desaparecendo com a escamação da pele (PROTA, 1996). É provável que as citocinas estejam envolvidas na comunicação entre estas células (PAWELEK et al., 1992).

Os melanossomos passam por quatro estágios. No primeiro são esféricos, contendo tirosina em grande quantidade. No segundo são ovais, sem melanina. No terceiro apresentam intensa atividade enzimática e início da produção de melanina e no quarto apresentam forma oval, atividade enzimática baixa e grande quantidade de melanina (STEINER, 1996b).

A transferência dos melanossomos para os queratinócitos é explicada pelos seguintes mecanismos: por um processo de citofagocitose, injeção direta de melanossomos no citoplasma dos queratinócitos ou liberação dos melanossomos no espaço extracelular seguido de sua incorporação aos queratinócitos. A degradação dos melanossomos ocorre no interior do fagolisossomo através dos intraqueratinocitários por ação das enzimas lisossomais, em particular as fosfolipases ácidas. A eliminação da melanina ocorre pelo processo natural de escamação e outra parte, via linfática, através da derme (VIGLIOGLIA, 1989).

Além do estímulo das radiações UV que leva a um aumento de tamanho dos melanócitos e da atividade da tirosinase (STEINER, 1996b), foi evidenciada a participação do hormônio melanócito estimulante (MSH) na síntese da melanina. O MSH é classificado em alfa, beta e gama (STEINER, 1996b), e é constituído por uma estrutura peptídica contendo 12 a 18 aminoácidos. A produção deste hormônio ocorre na glândula pituitária, mas existem fortes evidências de sua produção na pele e outros tecidos (PAWELEK et al., 1992). Além do melanócito, foi também verificada

a presença de receptores do MSH nos queratinócitos, mas o seu mecanismo de ação nestas últimas células ainda não está muito bem esclarecido. A injeção de MSH em cobaias estimulou a síntese de melanina de maneira similar à exposição à radiação UV. Verificou-se, além disso, que a exposição a estas radiações aumentou o nível de circulação de MSH em humanos e cobaias (PAWELEK et al., 1992).

STEINER (1996b) cita outros hormônios que interferem na pigmentação da pele como hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), estrógeno e progesterona.

A cor da pele está relacionada a influências genético-raciais. Na pele negra, os melanossomos são maiores, mais numerosos, não se agrupam, possuem alta concentração de melanina e sofrem degradação mais lenta, chegando quase intacto nas camadas mais externas da epiderme principalmente na camada córnea, diferentemente de peles mais claras onde esta degradação é maior nestas camadas, ficando a melanina restrita a camadas mais internas da epiderme. Os albinos possuem melanócitos, mas não produzem melanina devido à ausência da tirosinase (PENTAFARMA, 1997b; STEINER, 1996b).

Complementando os tópicos apresentados, NORDLUND e colaboradores (1989) revisaram a história da biologia da célula pigmentar. Inicialmente eles relataram a presença das cores na natureza, nas manifestações artísticas e nos diferentes grupos étnicos. Analisaram as descobertas e estudos feitos nos períodos de 1900 a 1950, de 1950 a 1975, de 1975 a 1987, abordando sempre questões como: nome da célula pigmentar, origem embriológica, produção de melanina, via metabólica, estrutura, transferência, degradação, excreção, regulação da função melanocitária, proliferação, doenças, função do melanócito e interação celular.

3.2 HIPERPIGMENTAÇÃO

Discromias são modificações na coloração normal da pele por diferenças quantitativas de pigmentos (FONSECA, SOUZA, 1986).

Hipercromias são distúrbios caracterizados pelo aumento da concentração de melanina, acumulação de hemossiderina ou hiper胡萝卜素 na pele. As manchas melânicas ocorrem, em geral, devido a um aumento de pigmentação local, em certos casos devido a um aumento do número de melanócitos como nas lentigens (CHARLET, 1996).

Segundo CASTRO e colaboradores (1997), vários fatores induzem a hiperpigmentação: envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamentos com hormônios sexuais e queimaduras de sol, sendo que as radiações solares, seguidas pelos hormônios e/ou agentes externos como os radicais livres são considerados os principais fatores.

3.2.1 Classificação das Hiperpigmentações

AMINI e HERNÁNDEZ (1995) dividem as hiperpigmentações em primárias e secundárias. No primeiro caso mencionam: lesões névicas, lentigens, efélides, melasma (cloasma gravídico), manchas café com leite, melanose periorbitária hereditária, melanose dérmica (mancha mongólica, nevo de oitô, nevo de toa e nevo azul), nevo de Becker e melanoma.

Como secundárias, citam: hiperpigmentações residuais pós-inflamatórias devido a enfermidades do tipo eczematosas, bolhosas, autoimune, infecciosa, papulo-escamosa: associadas aos fatores endócrinos, transtornos metabólicos, carências nutricionais, agentes químicos e farmacológicos, fotodermatites, doenças neoplásicas, tatuagens e às enfermidades congênitas.

3.2.1.1 Melasma ou cloasma

Pigmentação caracterizada por manchas em tom castanho na face, quase sempre simétrica que ocorre na testa e maçãs do rosto, aparecendo com frequência em mulheres morenas (TUROVELZKY, 1992). Histologicamente demonstra aumento da concentração da melanina na camada basal e suprabasal e às vezes, macrófagos repletos de melanina na derme (DUGGAN, 1989).

O melasma é estimulado pela exposição solar e, particularmente quando ocorre em mulheres grávidas, é chamado cloasma (TUROVELZKY, 1992). Aparece no primeiro mês de gravidez acentuando-se progressivamente devido ao enorme aumento de estrógeno e hormônios melanoestimulantes (MSH e ACTH). Pode também ocorrer em mulheres que fazem uso de anovulatórios, apresentando mecanismo semelhante. A ocorrência em mulheres jovens e homens não é muito freqüente, mas pode ocorrer no último caso principalmente naqueles que fazem tratamento de câncer de próstata a base de estrógeno (BEZERRA, REBELLO, 1996; BOYLE, KENNEDY, 1986).

A ocorrência desta hiperpigmentação pode ser classificada como dérmica, epidérmica ou mista (CHARLET, 1996).

Outros fatores que influenciam a formação do melasma: transtornos ginecológicos, tireoideanos ou da suprarrenais, menopausa, carência vitamínica, cirrose hepática e radiação (VIGLIOGLIA, 1989).

3.2.1.2 Sardas ou efélides

Manchas castanhas claras de 1 - 2 mm de diâmetro, que aparecem na infância após exposição solar. Possuem caráter hereditário autossômico dominante, característico de pessoas ruivas ou de olhos azuis, onde ocorre um aumento de melanina na epiderme e não do número de melanócitos (BEZERRA, REBELLO, 1996; CHARLET, 1996; STEINER, 1996a).

3.2.1.3 Lentigens

Manchas escuras de coloração uniforme, isoladas ou agrupadas, encontradas em qualquer parte do corpo e que ocorrem devido ao aumento do número de melanócitos da camada basal (CHARLET, 1996).

3.2.1.4 Lentigens actínicas (melanoses actínicas)

Manchas de 0,5 a 2 cm que ocorrem nas mãos, rosto e colo após os 40 anos, principalmente em peles muito claras, devido a uma hiperpigmentação dos queratinócitos basais e aumento do número de melanócitos (STEINER, 1996a).

3.2.1.5 Lentigens senis ou de luz solar

Hiperpigmentações melânicas, marrons em várias tonalidades, que ocorrem em regiões da camada basal da epiderme. Aparecem em indivíduos com mais de 50 anos, no rosto, parte externa do braço e antebraço, com histórico de exposição solar. Algumas manchas são chamadas queratoses, diferenciando-se das solares com relação ao toque (BEZERRA, REBELLO, 1996, CHARLET, 1996).

3.2.1.6 Melanoses por fotossensibilizantes

- Melanose de Riehl

Descrita em 1917 por Riehl. Conhecida também como eritrose atrofiante da face de Pautrier. Surge, muitas vezes, após a exposição ao sol, aparecendo primeiramente eritema com prurido, a que segue a pigmentação. Toda pele da face pode ser atingida, bem como o pescoço (FONSECA, SOUZA, 1986; VIGLIOGLIA, 1989).

Uma característica freqüentemente observada é o aspecto reticulado da pigmentação principalmente nas áreas temporais e no pescoço, onde a pele pode tornar-se atrófica. A histopatologia caracteriza acúmulo de melanina na derme, sobrecarga melânica, acompanhada de reação inflamatória (FONSECA, SOUZA, 1986).

- Melanodermite de Hoffmann – Habermann

Descrita em 1918 por Hoffmann e Habermann sob o nome de melanodermite linquenóide e bolhosa. É uma pigmentação que atinge, sobretudo as mãos e antebraços. Ocorre ceratose folicular, bem como pápulas linquenóides, pequenas bolhas e discreta atrofia. Surgem devido ao manejo por longos períodos de óleos minerais, alcatrões, petróleos e outros hidrocarbonetos (FONSECA, SOUZA, 1986; VIGLIOGLIA, 1989).

- Poliquilodermia de Civette

Verifica-se principalmente em mulheres de peles claras, de meia idade, pré ou pós-menopausa, com ocorrência nos dois lados e no vão do pescoço, pigmentação tênue, reticulada, com telangiectasia e atrofia de grau variado, vinculado a fotossensibilização por cosméticos (VIGLIOGLIA, 1989).

- Fitodermatoses

Sensibilização por psoralenos que são encontrados em frutas cítricas e algumas plantas. Produz-se uma pigmentação na zona de contato, pode ser provocada, também, por perfumes que apresentam essência de bergamota (VIGLIOGLIA, 1989).

3.2.1.7 Melanoses tóxico-medicamentosas

Provocadas pela ingestão de alguns medicamentos como: pirazonas, fenolftaleína, anfetaminas, anti-histamínicos, barbitúricos, cloroquina, codeína, dietilbestrol, ergotamina, fenotiazina, hidantoína, hidrazina, meprobamato, reserpina, sulfonamidas e quase todos os antibióticos.

Caracterizam-se por manchas arredondadas, bem delimitadas, únicas ou múltiplas, ocorrem preferencialmente em regiões genitais podendo ocorrer também em qualquer parte do corpo, normalmente acompanhadas de pruridos e em algumas ocasiões com bolhas (FONSECA, SOUZA, 1986; VIGLIOGLIA, 1989).

3.2.1.8 Melanose pós-inflamatória ou melanodermias residuais

Ocasionadas por traumatismos cronicamente repetidos, queimaduras, infecções cutâneas, eczemas, dermatite de contato não fotoalergênica, dentre outros. Ocorrem principalmente em pessoas de pele mais escura com conseqüente hiperpigmentação da epiderme e derme (FONSECA, SOUZA, 1986; VIGLIOGLIA, 1989).

3.2.1.9 Nevus (pigmentações lunares)

Manchas escuras, circunscritas, pequenas, congênitas, ou adquiridas tardiamente, ocorrendo em quase todas as pessoas (CHEDEKEL, ZEISE, 1996).

3.3 DESPIGMENTANTES

3.3.1 Conceito

São produtos destinados a clarear certos pontos ou regiões da pele com finalidade estética, sendo normalmente indicados para prevenção ou tratamento de hiperpigmentações (PENTAFARMA, 1997a).

3.3.2 Classificação

De acordo com seu mecanismo de ação (LEE, KIM, 1995; MASUDA, TEJIMA, SUZUKI, 1996; PROTA, 1996), os clareadores são agrupados em dez categorias:

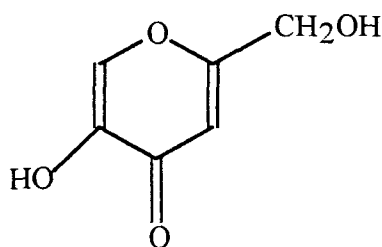
- 1- Inibição direta da atividade da tirosinase.
- 2- Inibição competitiva e não competitiva da tirosinase.
- 3- Supressão da síntese ou maturação da tirosina.

- 4- Toxicidade melanocitária seletiva.
- 5- Esfoliante.
- 6- Adsorção de melanina pré-formada.
- 7- Inibição indireta da tirosinase via quelação de oligoelementos.
- 8- Agentes redutores.
- 9- Estimulação da eliminação da melanina dos queratinócitos.
- 10- Inibição da síntese da tirosinase.

3.3.3 Agentes clareadores

3.3.3.1 Ácido kójico

O ácido kójico, comumente chamado de 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona apresenta fórmula molecular $C_6H_6O_4$ e peso molecular 142.11 (THE MERCK INDEX, 1983). A estrutura do ácido kójico está demonstrada na Figura 4.



Ácido Kójico

Figura 4: Estrutura do ácido kójico (THE MERCK INDEX, 1983).

Apresenta-se como um pó cristalino branco amarelado. O seu pKa é de 7,9 a 8,03. Miscível em água, etanol 95°GL e acetona, muito pouco solúvel em éter, acetato de etila e clorofórmio (THE MERCK INDEX, 1983).

O ácido kójico é um antibiótico produzido por muitas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, em aerobiose, em meio contendo alto teor de fonte de carbono, a partir da fermentação do arroz (CASTRO, PIMENTA, DORANE, 1997; LEONARDI, MAIA CAMPOS, 1997; PEREIRA, 1993). MAEDA e FUKKA (1996) citam o ácido kójico como obtido a partir da fermentação do fungo *Koji mold*. O ácido kójico quela o íon cobre e suprime a tautomerização do dopacromo a 5,6-dihidroxiindol-2-ácido-carboxílico, inibindo a ação da tirosinase (CABANES et al., 1994).

ELLIS, TAN e ELLIS (1995) sugeriram a aplicação do ácido kójico a 2 %, em formulações, juntamente com os ácidos salicílico, cítrico e láctico no tratamento de hiperpigmentações.

O ácido kójico induz a redução da eumelanina e de seu monômero precursor chave; possui ação antiirritante, é hidrossolúvel, estável no intervalo de pH 3,0 - 5,0 e compatível com bases não iônicas, podendo ser associado ao ácido glicólico (MAIA CAMPOS, 1995).

GARCIA e FULTON (1996) associaram ácido glicólico com hidroquinona e ácido kójico para o tratamento clínico de melasma e testaram em 39 pacientes. Os resultados obtidos não foram estatisticamente diferentes. A formulação com ácido kójico foi mais irritante, mas ambas foram eficientes.

Recomenda-se usar quelantes, evitar ésteres e adicionar tampões com ácido cítrico nas formulações (CHARLET, 1996; LEONARDI, MAIA CAMPOS, 1995). A concentração usual é de 1 a 3 %.

O ácido kójico não apresenta efeitos colaterais podendo ser usado durante o dia e não é citotóxico (BEZERRA, REBELLO, 1996; PEREIRA, 1993). Há evidências de boa tolerância a longo prazo (CASTRO, PIMENTA, DORANE, 1997).

3.3. 3. 2 Ácido glicólico

Esfoliante (BOYLE, KENNEDY, 1986), melhora os transtornos da pigmentação, como manchas actínicas e melasmas. É empregado diariamente na concentração de 8 a 12 % ou 5 a 10 %, agindo sinergicamente com outros despigmentantes como hidroquinona e ácido kójico (ARCHIPRE, 1996; BOYLE, KENNEDY, 1986).

3.3.3.3 Ácido retinóico

Esfoliante (BOYLE, KENNEDY, 1986; PEREIRA, 1993), dispersa os grânulos de melanina nos queratinócitos, aumenta a renovação celular e diminui a ação da colagenase. Atua em melasma e em hiperpigmentações pós-inflamatórias. Estudos com a tretinoína a 0,1 % demonstraram a redução de manchas pigmentares fotoinduzidas. Quando utilizada na dose de 0,01 a 0,1 %, deve-se empregar filtro solar após sua aplicação (PEREIRA, 1993). Durante a sua utilização e dependendo da concentração podem ocorrer reações, como eritema, prurido, descamação e

sensação picante (CHARLET, 1996). A tretinoína pode ser associada a substâncias ativas despigmentantes com a finalidade de promover a esfoliação e facilitar a penetração das substâncias associadas (MAIA CAMPOS, 1995) ocasionando leve clareamento da pele.

FOX (1995; 1996) revelou novos usos para o ácido retinóico no tratamento da hiperpigmentação em peles escuras e abordou aspectos sobre a segurança do uso da hidroquinona. Segundo o autor, a concentração máxima da substância ativa não deverá exceder 1 % em formulações aquosas de uso breve, descontínuo, seguido de enxágüe da região.

BULENGO-RANSBY e colaboradores (1993) utilizaram tretinoína tópica 0,1 % no tratamento de hiperpigmentações pós-inflamatórias em pacientes negros. Os resultados obtidos foram bastante significativos.

3.3.3.4 Hidroquinona

A hidroquinona é um composto dihidroxifenólico que inibe a atividade da tirosinase, evitando a sua oxidação a DOPA; além disso, diminui a melanina cutânea através da sua toxicidade melanocitária (CHARLET, 1996; MENTER et al., 1993; PEREIRA, 1993), o que acelera a degradação dos melanossomos.

Pelo fato de ser irritante, deve-se evitar a utilização próxima à área dos olhos, em regiões com lesões cutâneas ou com queimaduras solares, em crianças menores de 12 anos e ainda, durante o dia (LEONARDI, MAIA CAMPOS, 1997; PEREIRA, 1993).

CASTRO e colaboradores (1997) sugerem uso de filtro solares concomitante ao tratamento.

As concentrações usuais da hidroquinona empregadas nas formulações são de 2 a 5 %, apresentando eficácia na melanose solar, efélides e melasma (PEREIRA, 1993). Não é eficaz nas hipermelanoses dérmicas a não ser quando associadas a um componente epidérmico. Em produtos cosméticos pode ser usado em uma concentração máxima de 2 % (BEZERRA, REBELLO, 1996). A ação da hidroquinona é aumentada pela associação com ácido láctico e retinóico (CHARLET, 1996).

LOWER (1995) sugeriu o uso de hidroquinona 2 % com 8% de ácido glicólico para cosméticos étnicos.

FONSECA e PRISTA (1984) sugeriram o uso de hidroquinona em solução alcoólica a 5 %, em pomada ou creme na concentração de 2 a 10% na presença de antioxidantes, aplicada três vezes ao dia, durante quatro a seis meses. Os autores advertem, no entanto, que há possibilidade do aparecimento de dermatite de contato ou sensibilização.

Vários efeitos colaterais já foram observados na utilização da hidroquinona, como por exemplo, a irritação dérmica, principalmente nas concentrações de 5 a 10 %. Entretanto neste intervalo foram obtidos os melhores resultados despigmentantes. Efeitos colaterais como dermatite de contato, fotossensibilização, ocronoses, pseudo *milium* colóide, hiperpigmentações transitórias no início do tratamento, despigmentação em confete nas regiões anteriormente tratadas, eritema e despigmentação irreversível, também foram verificados (BEZERRA, REBELLO, 1996).

A hidroquinona se oxida com facilidade alterando a cor de marrom claro para marrom escuro (PEREIRA, 1993). Sistemas antioxidantes eficazes devem ser utilizados nas formulações (BEZERRA, REBELLO, 1996).

3.3.3.5 Ácido L – Ascórbico

O ácido L – ascórbico reduz o intermediário necessário para a síntese da melanina (MASUDA, TEJIMA, SUZUKI, 1996), mantendo-o na forma reduzida e incolor. A inativação da tirosinase é interrompida até a transformação oxidativa da tirosina em DOPA. Possui ação anti-radicais livres, oxida-se facilmente, apresentando baixa penetração em veículos aquosos.

3.3.3.6 Arbutina

A arbutina é um heterosídeo da hidroquinona, presente em várias plantas da família das Ericáceas (PEREIRA, 1993; ROUGIER et al., 1983); obtida a partir do extrato de Uva-ursi (MASUDA, TEJIMA, SUZUKI, 1996). Apresenta citotoxicidade 100 vezes menor do que a hidroquinona e reduzida irritabilidade com pequena possibilidade de hipopigmentação irreversível (CHARLET, 1996; MAEDA, FUKURA, 1996; PEREIRA, 1993).

A arbutina inibe a atividade da tirosinase (MASUDA, TEJIMA, SUZUKI, 1996), competindo com a DOPA em seu sítio receptor, inibindo sua ação (PEREIRA, 1993).

Apresentou resultados satisfatórios em efélides, melanoses solares e melasma (PEREIRA, 1993).

As concentrações empregadas freqüentemente são de 0,5 a 3,0 % (BEZERRA, REBELLO, 1996) e é aconselhável empregar quelantes nas formulações (LEONARDI, MAIA CAMPOS, 1997).

3.3.3.7 Peptídeos selecionados e fracionados (Melawhite®)

É uma solução clara, amarelada, contendo peptídeos seletivamente fracionados. O Melawhite® é considerado inibidor específico e competitivo da tirosinase (PENTAFARMA, 1997b). Minimiza a formação de manchas na pele devido a sua ação no estágio inicial de melanogênese. A concentração usual é de 2 a 5 % (BOYLE, KENNEDY, 1986).

3.3.3.8 Fosfato de ascorbil magnésio (VC-PMG®)

Penetra na pele liberando ácido ascórbico que inibe a ação da tirosinase, sendo estável em soluções aquosas e valores de pH acima de 7,0 (LEONARDI, MAIA, 1997). Tem melhor penetração do que o ácido ascórbico livre, apresentando melhores resultados em melasmas, melanose solar, efélides e lentigo senil (PEREIRA, 1993). A concentração empregada usualmente nas formulações contendo VC-PMG® é de 1 a 3 % podendo chegar a 15 %. Além dos efeitos citados, estimula a síntese de colágeno e fibroblastos e inibe a ação dos radicais livres (PEREIRA, 1993). O ácido ascórbico age como potente redutor estimulando a redução da velocidade das reações, principalmente na primeira etapa de oxidação DOPA a DOPAquinona (TAKENOUGH et al., 1994).

O VC-PMG® possui também ação anti-radicaís livres (BOYLE, KENNEDY, 1986). KAMEYAMA e colaboradores (1996) avaliaram o efeito inibidor, *in vitro* e *in vivo*, do VC-PMG® na melanogênese e concluíram que o ingrediente ativo apresentou-se como efetivo despigmentante em alguns pacientes.

3.3.3.9 Silicato de alumínio sintético (Antipollon HT®)

Este composto apresenta atividade despigmentante gradual, e é indicado no tratamento de cloasma (CHARLET, 1996). Seu efeito clareador é devido à adsorção

da melanina pré-formada. Não é irritante, nem sensibilizante, podendo ser usado durante o dia (LEONARDI, MAIA, 1997; PEREIRA, 1993). Estável em valores de pH de 4,0 a 10,0. Sua associação a ácidos graxos não é recomendada (LEONARDI, MAIA, 1997). A concentração usualmente empregada nas formulações é de 1 a 4 % (BEZERRA, REBELLO, 1996).

3.3.3.10 Ácido azeláico (ácido 1,7 – dicarboxílico nítrico nonadióico)

Obtido pela oxidação do ácido oléico pelo ácido nítrico, possui atividade anti-tirosinase, inibidor das enzimas de óxido redução e ação antioxidante. Usado no tratamento de despigmentações pós-inflamatórias e melasma em concentrações de 2 a 9 %. Não apresenta toxicidade, teratogenicidade e mutagenicidade (CHARLET, 1996; DUGGAN, 1989; PATHAK et al., 1985).

PATHAK e colaboradores (1985) avaliaram a efetividade do ácido azeláico como despigmentante e quimioterápico e concluíram que este composto não é seletivamente citotóxico para melanócitos normais e proliferativos e também não apresenta aparente efeito inibidor do processo de formação da melanina.

3.3.3.11 Extratos vegetais

Os compostos extraídos da *Rheum officinale* (ruibarbo) mostraram inibição competitiva da tirosinase e inibição da biossíntese da melanina (LIDA et al., 1995).

Da *Achillea millefolium* (achillea mil folhas) e da *Cynara scolymus* (alcachofra) é extraída a melanolisina, constituída pela luteolina e seus heterosídeos. Esta substância produz perda da relação espacial entre melanócitos e queratinócitos, sendo indicada nos tratamentos de melasma, efélides, melanose solar e certas melanodermias pós-inflamatórias. Recomenda-se tratamento de manutenção (PEREIRA, 1993).

Outro extrato vegetal com propriedades despigmentantes, que provém da casca da raiz de *Paper mulberry* (amora) além de inibir a melanogênese apresentou ação anti-radicaís livres (LAWRENCE, COX, BROADY, 1997).

MATSUDA, NAKAMURA e KUBO (1994) verificaram o efeito inibidor de melanina de várias plantas do gênero *Prunus* e sugeriu a *Prunus zippeliana* (ameixa) como importante agente clareador da pele em hiperpigmentação.

3.3.3.12 Extrato aquoso de Uva-ursi (MELFADE®)

Nome comercial do extrato aquoso de Uva-ursi (*Arctosphylos uva-ursi* L. Spreng). Este produto possui várias propriedades como a de inibir o escurecimento da pele, de diminuir a pigmentação existente, de interferir nas etapas enzimáticas de síntese da melanina, de degradar a melanina existente, alterar a membrana das organelas dos melanócitos e de acelerar a degradação dos melanossomos (CHARLET, 1996).

3.3.3.13 Ácido fítico (hexafosfato de inositol)

Obtido a partir das sementes de cereais como aveia, arroz, gérmen de trigo, etc. Antioxidante, quelante potente de metais como ferro e cobre, inibidor da tirosinase. Ideal para hiperpigmentações de diversas etiologias e para as peles sensíveis (MENE et al., 1996; TELLES, 1997). Nas formulações pode ser empregado a 0,5 % associado ao ácido glicólico a 8 % (MENE et al., 1996).

Além destes despigmentantes, outros são citados na literatura como: água oxigenada a 20 volumes, monometil éter de hidroquinona, 4-isopropil catecol e β -caroteno (PEREIRA, 1993), 2-aril-1,3-tiazolinas (NAPOLITANO et al., 1991), mercaptominas, tais como cloreto de *n*-dimetil-amina (2-mercaptoetila) e cloreto de β -caroteno-etilamina. Estes compostos, no entanto, podem apresentar efeitos colaterais irritantes e citotóxicos. CASTRO e colaboradores (1997) citaram também as nanotalasferas de β -caroteno e os flavonóides da classe citrus, que apresentaram atividade inibidora da tirosinase devido a sua estrutura fenólica e antioxidante (CHARLET, 1996).

3.4 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS

As formas farmacêuticas semi-sólidas são preparações designadas para exercerem atividade local quando aplicados sobre a pele e mucosas acessíveis ao meio externo. São também denominadas de medicamentos tópicos e apresentam-se basicamente nas formas de pomadas, pastas, cremes e géis. Para que haja o efeito terapêutico é necessário, inicialmente, que ocorra a aderência do medicamento no local de ação, formando um filme para que, posteriormente, por uma força externa possa deformar-se e fluir. Devem ser aplicados em quantidades tal que, mantenham

uma concentração efetiva no sítio de ação. O tratamento local é orientado por vários fatores como: pela causa, composição sintomática (tipo de sintomas subjetivos), complicações e extensão da afecção cutânea. Este conjunto de fatores apresenta variações próprias a cada afecção, portanto, deve-se evitar o uso irracional de fórmulas pré-estabelecidas. Não há esquema terapêutico que possa ser indicado, sistemática e indiscriminadamente, a todos os casos do mesmo problema. Os medicamentos devem ser escolhidos de acordo com o efeito que se deseja, com veículos ou bases adequadas, compondo a fórmula, respeitando o limite de lesividade dos agentes (BECHELLI, CURBAN, 1988).

3.4.1 Emulsões

Emulsões são preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis. De acordo com a hidrofobia ou lipofilia da fase dispersante classificam-se os sistemas em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

Na fase aquosa são dissolvidos componentes hidrossolúveis como umectantes, princípios ativos, conservantes, corantes, espessantes, etc. Assim, a água é um veículo importante na fabricação e aplicação das emulsões. Tem ainda a função de manter a elasticidade e juventude da epiderme, com o auxílio dos emolientes, umectantes e emulsionantes adequados, mantendo a pele hidratada. Exerce também funções indispensáveis ao equilíbrio físico-químico da emulsão e do agente umectante. Preferencialmente deve ser usada água destilada ou deionizada, isenta de sais minerais e produtos orgânicos e microbiologicamente pura. A presença de íons e sais de cálcio constitui um elemento perturbador da estabilidade das emulsões (SANCTIS, 1999).

A fase oleosa constitui-se de componentes oleosos ou emolientes, responsáveis por características importantes como espalhamento, absorção, viscosidade, controle de umidade, sensação lubrificante e toque na pele. São também veículos para a incorporação de antioxidantes, vitaminas e ativos lipossolúveis, conservantes, agentes de consistência, etc. Os critérios para a classificação e seleção dos emolientes podem ser definidos de acordo com a sua composição química (hidrocarbonetos petroquímicos, triglicerídeos animais e

vegetais, ésteres de ácidos e álcoois graxos), propriedades físico-químicas (ponto de fusão, turvação, polaridade, estabilidade à hidrólise ácida ou alcalina) e quanto à aplicação na pele (espalhamento, toque oleoso ou seco, grau de absorção, comedogenicidade e toxicidade). Grande parte destas propriedades são atribuídas a estrutura química dos emolientes (SANCTIS, 1999). Além disso, o tipo de função química permite estabelecer previsões sobre a estabilidade à hidrólise química, tanto em meio ácido como em meio alcalino. Deve-se analisar ainda em nível de estrutura, o comportamento do produto quanto a ponto de turbidez e solidificação. Através deste estudo preliminar pode-se selecionar emolientes que influenciam a emulsão de maneira totalmente dirigida e controlada em todos os princípios técnicos, sensoriais ou mercadológicos (SAMPAIO, 1997).

Dependendo dos componentes, a viscosidade das emulsões pode variar muito, tornando-as líquidas ou semi-sólidas. As emulsões de uso externo aplicáveis sobre a pele, podem ser preparadas na forma A/O ou O/A, dependendo da natureza dos agentes terapêuticos incorporados, necessidade de um emoliente na fórmula e situação da superfície cutânea. A irritação causada por certos fármacos sobre a pele tem o efeito minimizado quando esses estão presentes na fase interna de uma forma emulsionada e não na fase externa, o que tornaria mais direto o contato com a pele. Naturalmente, a miscibilidade ou a solubilidade em óleo e em água da substância ativa que será utilizada, determinará em grande parte, o veículo no qual deverá estar presente, e sua natureza indicará a fase da emulsão que deverá converter-se à preparação resultante. As emulsões A/O também são mais emolientes para a pele, pois resistem mais a secagem e à retirada pela água. Por outro lado, se o objetivo for a obtenção de uma fórmula removível da pele pela água, deve-se dar preferência às emulsões O/A (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000).

Na elaboração de uma emulsão estável, é necessário um terceiro componente, constituído por emulsionantes (tensoativos), são substâncias que atuam sobre a tensão superficial de líquidos imiscíveis, facilitando a obtenção e estabilização (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

A principal preocupação na seleção dos emulsionantes para uso em produtos para a pele é conseguir o máximo de efeitos de emulsificação, solubilização e dispersão provocando, ao mesmo tempo, o mínimo de reações desfavoráveis com as estruturas das células epidérmicas. Os efeitos danosos dos tensoativos sobre a

pele manifestam-se como ressecamento, aspereza e descamação. Além disso, podem surgir sintomas de inflamação (vermelhidão e inchaço). Nos casos graves, ocorre a destruição total do tecido (necrose). A pele perde as gorduras devido à propriedade (mais ou menos pronunciada) dos tensoativos de emulsificar os lipídios e assim remover, parcial ou totalmente, a película superficial destes. Isto resulta em perturbação da função barreira da pele, levando ao aumento da permeabilidade às substâncias químicas e a perda de água. Além disso, existe a perda de componentes hidrofílicos de baixo peso molecular, que colaboram para a manutenção da flexibilidade e extensibilidade da pele. Para a população em geral, o uso normal de tensoativos em produtos de consumo não provoca problemas cutâneos sérios (IDSON, 1997).

Uma classificação usual dos emulsionantes é em função da estrutura molecular que considera a natureza dos seus grupos polares.

Aniônicos: quando em solução aquosa sofrem dissociação onde a parte polar da molécula é aniônica. Os cátions presentes geralmente são íons inorgânicos como sódio e cálcio, íon amônio e alcanolamina. São exemplos: sabões, alquil sulfatos, alquil éter sulfatos, alquil sulfonatos, sulfossuccinatos, etc. São, via de regra, superiores aos demais quanto ao poder de espuma e na capacidade detergente, sendo também bons emulsionantes. O grupo apolar é constituído por cadeia alifática, ramificada, linear. Alquil sulfatos são compostos empregados no preparo de emulsões O/A, como por exemplo, o cetilsulfato de sódio. Os fosfatos, de introdução recente, possuem semelhança com os fosfolípidos, constituintes do estrato córneo da membrana celular e produzem emulsões contendo gotículas pequenas e homogêneas. Melhor estabilidade é obtida com o emprego dos ésteres do ácido ortofosfórico em combinações com outros tensoativos não iônicos. Derivados dos ácidos graxos ou álcoois graxos formam uma fase líquida cristalina, contribuindo para aumentar o poder de oclusividade e, conseqüentemente, maior retenção de água. Os mais utilizados são os ésteres ortofosfóricos dos ácidos graxos polietoxilados, na forma de mono e diésteres (SANCTIS, 2000).

Catiônicos: quando em solução aquosa sofrem dissociação, onde a parte polar é catiônica e a parte apolar formada por uma cadeia alifática, linear e ramificada. São exemplos os sais quaternários de amônio (sais de alquil trimetil amônio, sais de dialquil dimetil amônio e sais de alquil dimetil benzil amônio) e

imidazolinas. Proporcionam sistemas estáveis com álcoois graxos e formam emulsões O/A ou A/O. Possuem propriedades bactericidas, mas são irritantes em concentrações elevadas, instáveis em meio alcalino. Amplamente utilizados em condicionadores de cabelo (JATO, 2000).

Anfóteros: o poder tensoativo e emulsificante são dependentes do pH do meio. No ponto isoelétrico estes compostos possuem comportamento não iônico e dependendo do pH do meio em que estão dispersos, exibem as propriedades do grupo polar catiônico ou aniônico. A solubilidade, atividade tensoativa e poder emulsificante são menores que dos compostos aniônicos e catiônicos. São exemplos as betaínas e os aminoácidos. Atuam como co-tensoativos para bases detergentes proporcionando efeito de espessamento, incremento e estabilidade de espuma, condicionamento e de redução da irritabilidade à pele e aos olhos, usual em xampus e sabonetes líquidos (JATO, 2000).

Não iônicos: quando em solução aquosa não sofrem ionização, possuem grupo polarizado, mas não ionizável. A solubilidade em água é devida à hidratação dos grupos hidrofílicos, via pontes de hidrogênio. A porção hidrofóbica pode ser um grupo alquil ou alquil aril e a porção hidrofílica representada por grupos álcool, glicerol, sorbitol, amidoglicol, poliglicol, polietilenoglicol, polipropilenoglicol e alcanolamidas. São exemplos os alquil aril etoxilados, alcanolamidas de ácido graxo de coco, ésteres de glicerol, ésteres de glicóis, ésteres de polietilenoglicóis, ésteres de sorbitano, álcoois graxos etoxilados e aminas etoxiladas. Os emulsionantes não iônicos são os mais empregados atualmente (SILVA, SOARES, 1996). Os álcoois e ésteres polioxetilênicos, cuja fração lipofílica é representada pelos ácidos esteáricos, palmíticos, oléico e ricinoléico, são os não iônicos mais empregados atualmente e considerados os menos irritantes para a pele, pois não desnaturam as proteínas. Os derivados de lanolina, frações ricas em esteróis etoxilados são emulsionantes primários não iônicos complexos quimicamente e apresentam boas propriedades eudérmicas (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1991).

Demais componentes da emulsão:

Para regular a viscosidade da fase aquosa quando esta é externa, empregam-se hidrocolóides derivados da celulose e polímeros hidrófilos. Quando a fase contínua é de natureza oleosa, recorre-se ao emprego da lanolina ou outros corpos gordurosos e com características plásticas. Os espessantes, normalmente

são hidrossolúveis, agem como auxiliares emulsificantes, aumentando a viscosidade da fase externa evitando possíveis coalescências. Os produtos mais empregados para tais finalidades são as gomas, como a arábica, caraia e xantana, polímeros carboxivinílicos, derivados da celulose, etc. Deve-se evitar as possíveis incompatibilidades entre estes compostos e outras matérias-primas, substâncias iônicas e variações de pH (SILVA, SOARES, 1996).

Os umectantes impedem ou retardam a formação de cristais nas emulsões por evaporação da fase aquosa e a cristalização de algumas substâncias menos solúveis após a secagem da preparação. A glicerina, sorbitol e propilenoglicol são os umectantes mais empregados e possibilitam melhor aplicação, dada a ação lubrificante e suavizante que apresentam (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1991).

Os silicones representam um grupo de substâncias com um sensorial plenamente aceitável, principalmente para peles oleosas. Com seu toque seco e suave, proporcionam efeito sensorial superior aos hidrogéis tradicionalmente empregados para tratamento de peles oleosas. Espalham-se facilmente, com boa distribuição por toda a pele e não deixam resíduos após a evaporação. Os ciclometicones são fáceis de serem incorporados em emulsões que sejam O/A ou A/O. Os dimeticones apresentam solubilidade ou dispersibilidade em água, devido à combinação de cadeias carbônicas etoxiladas ligadas às cadeias principais de polidimetil-siloxano. São produtos inócuos, seguros e suaves, não causam ardência ou possuem qualquer papel alergênico. Além disso, podem ser excelentes carreadores ou veículos para os princípios ativos (GOMES, 1999).

Os estabilizantes são os antioxidantes, os tampões, os sequestrantes e os corretivos de pH. Os conservantes devem estar sempre presentes para a proteção contra o desenvolvimento de microorganismos, responsáveis por alterações dos cremes e por problemas que envolvem a sanidade cutânea (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1991).

De modo geral os constituintes da emulsão devem apresentar segurança toxicológica, ausência de compostos alergênicos, sensibilizantes e irritantes (SILVA, SOARES, 1996).

A emulsão geralmente apresenta coloração branca com aparência translúcida e cintilante, sendo esta a que agrada o consumidor, pois, emulsões opacas e sem brilho podem induzir à idéia de pobreza de composição ou de qualidade, ou ainda

problemas de processamento. Bolhas de ar também conferem um aspecto negativo às emulsões. Basicamente o que determina a aparência é o tamanho das partículas da fase interna que está relacionada, principalmente, com o tipo e quantidade de emulsionante, diferença de densidade entre as fases e condições de processo de agitação, temperatura e técnica de emulsificação.

Os mecanismos básicos de instabilidade das emulsões perceptíveis são descritos a seguir (RIEGER, 2000; SCHUELLER, ROMANOWSKI, 2000).

- **Cremagem (cremosidade):** com ou sem agregação e aumento do tamanho das partículas, sob a influência da gravidade, as partículas suspensas ou as gotículas tendem a sobrenadar ou sedimentar dependendo das diferenças das densidades específicas entre as fases dispersa e dispersante. A emulsão resultante fica com duas seções, uma delas tendo maior quantidade da fase interna e outra com maior quantidade de fase externa. Caso fiquem suspensas formam uma camada oleosa na superfície da emulsão sendo que esse fenômeno pode ser revertido por agitação.

- **Floculação:** durante esse processo as gotículas da fase interna formam uma associação fraca e reversível. Esse fenômeno é causado por uma carga inadequada sobre as micelas, o que reduz a força de repulsão entre elas. As duas partículas permanecem distintas na forma de bolhas, apenas se tocam e não há alterações nas dimensões. Essa associação pode ser facilmente rompida pela remoção de uma das partículas. A floculação pode ser revertida por meio da agitação do sistema, sendo um problema de pouca gravidade.

- **Coalescência:** quando duas gotículas da fase interna se aproximam o suficiente, e se unem para formar uma gotícula maior. Esse processo de crescimento das partículas é um problema sério para a estabilidade por ser irreversível. Quando um número grande de partículas coalesce, o resultado é uma separação completa das duas fases.

- **Inversão:** a separação é uma das conseqüências do processo de desestabilização da emulsão e a inversão de fase é outra conseqüência. Quando ocorre uma inversão de fase, a fase externa torna-se fase interna e vice-versa. Uma alteração dessa natureza é normalmente indesejável, porque as características físicas da emulsão resultante diferem da original.

- Química: devida à hidrólise dos tensoativos, destruição microbiana ou processos fotoquímicos.

- Outros fatores: temperaturas elevadas de armazenagem aceleram a desestabilização, ao passo que temperaturas baixas retardam.

Em algum grau, qualquer emulsão é susceptível a cada um dos processos de desestabilização. O impacto de tais processos sobre os diferentes tipos de emulsões pode ser variado. Diferentes métodos podem ser aplicados para determinar o grau de desestabilização, o mais importante é o da observação direta e determinação do pH (SCHUELLER; ROMANOWKI, 2000).

Uma emulsão estável é aquela que mantém os constituintes da fase oleosa dispersa na fase contínua, ou vice-versa, mesmo quando submetida a tensões decorrentes de temperatura, agitação e gravidade. Durante o desenvolvimento do produto farmacêutico, após a definição da formulação, torna-se difícil para determinar o prazo de validade do produto e avaliar a compatibilidade da emulsão com a embalagem. Dessa forma, os testes de estabilidade acelerada tornam-se uma ferramenta útil, sendo os mais comuns utilizados para emulsões descritos a seguir.

- Centrifugação: normalmente na velocidade de 2500 rpm por 1 hora ou 4000 rpm por 30 minutos. Baixos níveis de afloramento ou sedimentação podem até ser aceitáveis. Nessas condições, pode-se prever uma estabilidade para a emulsão de 16 semanas em repouso. A separação de água no fundo do tubo indica a necessidade de espessamento da fase aquosa com polímeros; a separação de fase oleosa na superfície indica a necessidade do acerto do equilíbrio hidrófilo – lipófilo (HLB) ou da quantidade de emulsionante.

- Variação da temperatura: geralmente realizado em estufas a 45°C, 40°C, temperatura ambiente e geladeira. Temperaturas elevadas diminuem a viscosidade da fase oleosa e alteram a solubilidade relativa dos emulsionantes em ambas as fases.

- Testes microbiológicos: o controle microbiológico durante o desenvolvimento do produto é realizado na forma de desafio microbiano com determinado número de microorganismos (bactérias e fungos), por 28 dias, a fim de avaliar a efetividade do sistema conservante empregado.

- Presença da luz: o produto é submetido à luz direta do sol quando em embalagens transparentes. Alguns equipamentos, tais como lâmpadas de infravermelho, simulam a luz do sol. Formulações espessadas com polímeros orgânicos podem sofrer redução na viscosidade devido ao contato com a luz durante a estocagem, o que é contornado utilizando-se protetores solares (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

3.5 ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

Os métodos *in vitro* possibilitam entender os fenômenos que ocorrem entre a administração do produto e o efeito medido farmacológica ou clinicamente, de maneira prática, rápida, sem a interferência de fatores biológicos. Geralmente, nos procedimentos *in vitro* para estudo de produtos dermatológicos, o princípio ativo difunde-se através de uma membrana artificial ou natural para uma solução receptora, onde é feita a determinação analítica do conteúdo de princípio ativo liberado ao longo do tempo.

3.5.1 Terminologias

Antes do relato de trabalhos realizados por vários autores, faz-se necessário esclarecer e uniformizar várias terminologias que são encontradas em diversos artigos científicos e livros, e, que também serão empregadas ao longo deste trabalho.

SHAH et al. (1992a) publicaram um interessante artigo no qual discutiram sobre os princípios e critérios para o desenvolvimento e otimização de produtos dermatológicos. Esses autores atentaram para o problema da mistura de termos que têm sido utilizados na designação dos processos que ocorrem nos estudos de liberação *in vitro* de medicamentos tópicos. Algumas definições foram estabelecidas.

a) Produto dermatológico: o local de ação é a pele. Deve apresentar uma alta retenção do fármaco na pele e pequeno fluxo através da mesma.

b) Produto de ação transdérmica: o efeito desejado é sistêmico. Deve apresentar baixa retenção do fármaco na pele e grande fluxo através da mesma.

- c) Fluxo de uma substância na pele: quantidade de substância que atravessa a pele em uma determinada área de superfície durante um intervalo de tempo.
- d) Permeação e absorção transcutânea ou percutânea: transporte de substância através da pele. Está relacionada com produtos transdérmicos.
- e) Retenção cutânea: localização de substâncias na pele.
- f) Permeável: capaz de ser atravessada ou capaz de atravessar a pele.
- g) Retentiva: capaz de aprisionar substâncias na pele ou capaz de ser aprisionada na pele.
- h) Permeabilidade: grau com que a pele é capaz de ser atravessada por uma substância.
- i) Retentividade: grau com que a pele é capaz de aprisionar uma substância.
- j) Permeante: substância que atravessa a pele.

3.5.2 Aparelhos utilizados nos testes *in vitro*

A literatura mostra que uma grande variedade de aparelhos, nos mais diferentes modelos, têm sido empregada em estudos de cinética de liberação e/ou permeação dos fármacos contidos em produtos de ação transdérmica e dermatológicos (BUSSE et al., 1969; DURRHEIM et al., 1980; FRANZ, 1975; GASCO, GALLARTE, PAPTARINO, 1991; GASCO, GALLARTE, PATTARINO, 1988; GUMMER, HINZ, MAIBACH, 1987; HADGRAFT, BEUTNER, WOLFF, 1993; HADGRAFT & RIDOUT, 1985).

Os aparelhos dos testes *in vitro* podem ser denominados de “células de liberação ou difusão”, cujos modelos e funcionamento são os mais variados. De maneira geral, as células de difusão funcionam por dois sistemas:

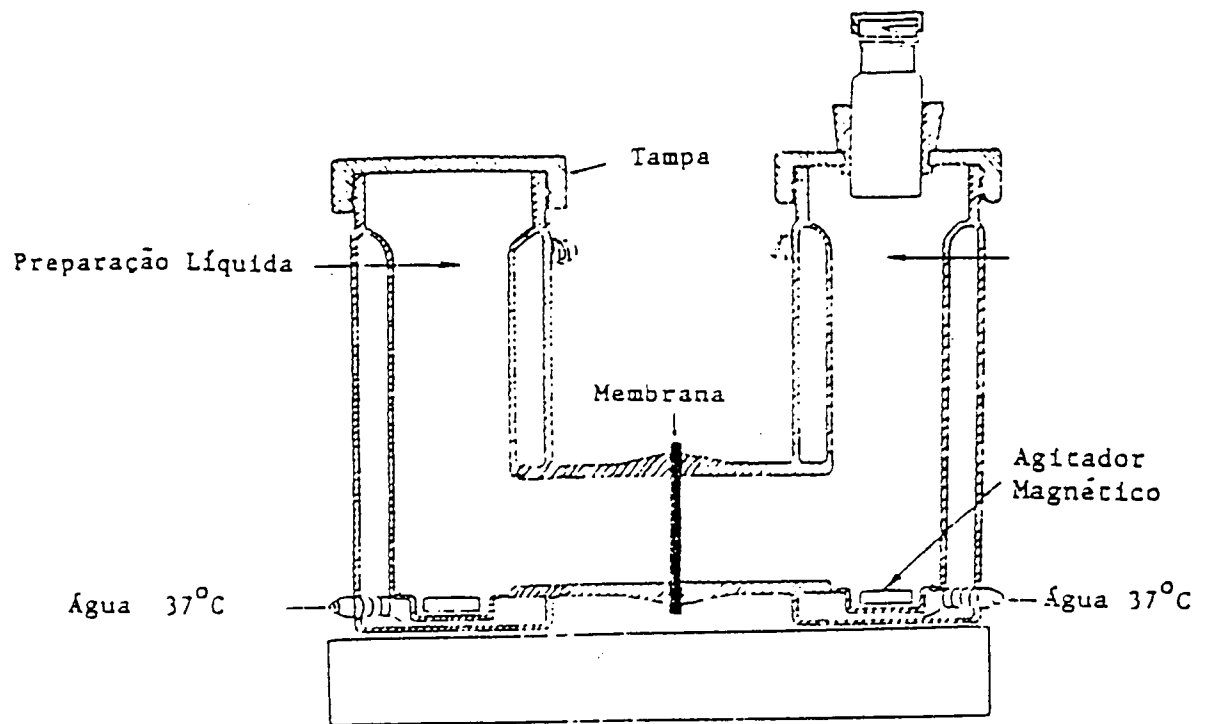
- a) Fluxo contínuo: onde a solução receptora é bombeada continuamente.
- b) Fluxo estático: onde o volume da solução receptora é o mesmo durante todo o experimento.

TOJO (1987) esquematizou os modelos mais comuns de difusão, conforme mostra a figura 5.

O modelo A representa um sistema de difusão horizontal, podendo ser fabricado para pequenos (3-4 ml) ou grandes volumes (140-290 ml), sendo que, a área de difusão (área da membrana disponível para a difusão) é proporcional a estes volumes. O modelo B mostra uma típica célula de difusão vertical projetada

por FRANZ (1975), e, que tem sido utilizada freqüentemente em estudos de cinética de liberação e absorção percutânea. Já o modelo C, representa uma típica célula de difusão de FRANZ modificada, a qual foi elaborada para solucionar os problemas que a anterior apresentava quanto à homogeneidade de mistura no compartimento receptor. O modelo D esquematiza uma célula de difusão vertical com disco rotativo acoplado a um copo de dissolução de um litro da Farmacopéia Norte-Americana (THE UNITED..., 1990).

A)



B)

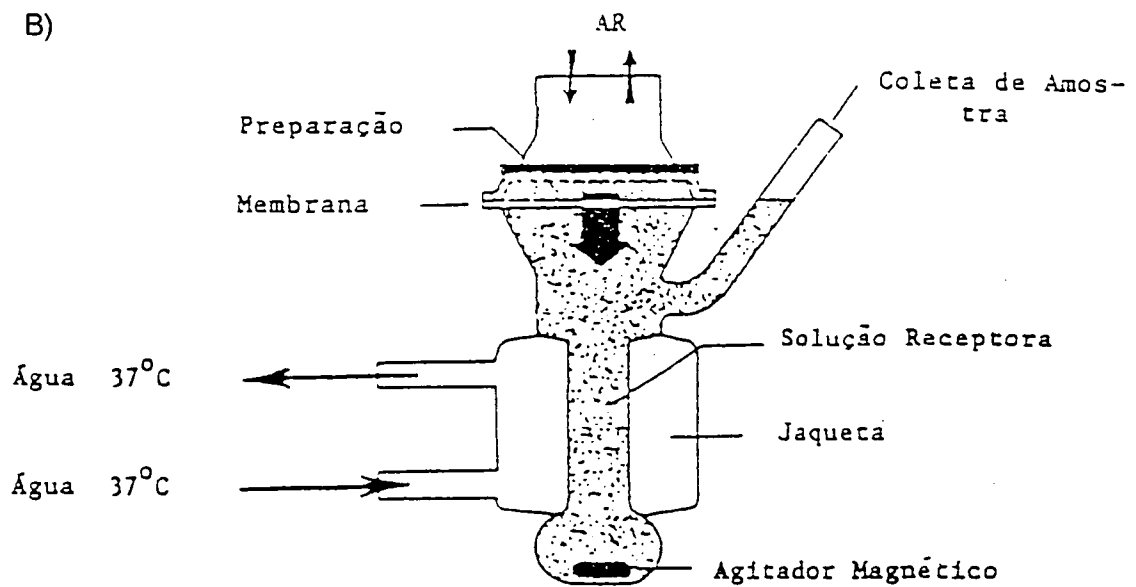
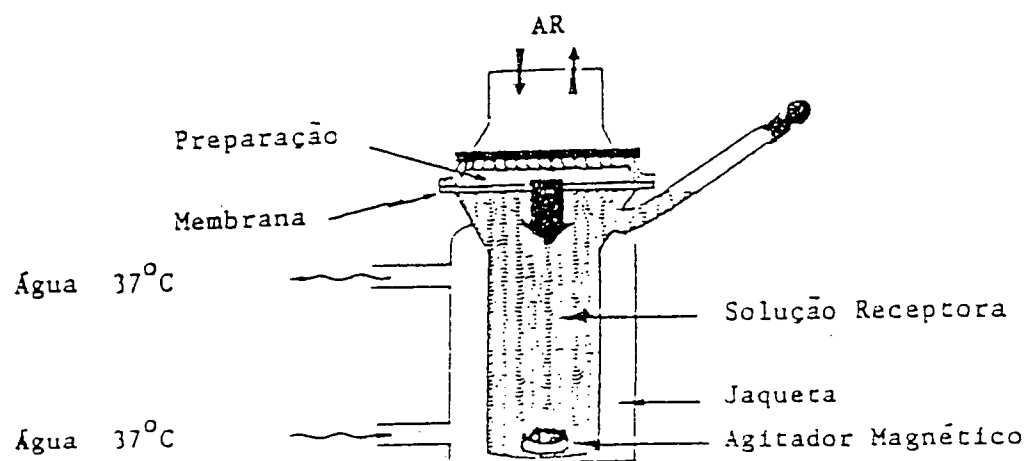
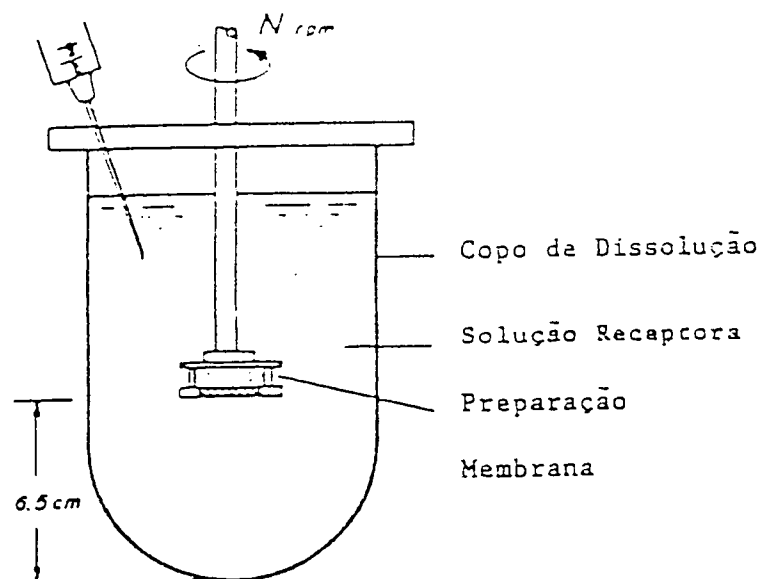


Figura 5: Modelos de células de difusão para estudos de liberação e/ou permeação de fármacos contidos em produtos dermatológicos (TOJO, 1987).

C)



D)



GUMMER et al. (1987) atentaram para o problema da diferença no desempenho das diversas células utilizadas nos estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea. Estes autores realizaram um estudo comparativo com diversas células de difusão quanto à uniformidade de agitação no compartimento receptor, bem como, o volume da fase receptora. Com base nos resultados obtidos foram selecionadas duas células de difusão de fluxo contínuo, as quais apresentaram as seguintes especificações: pequeno volume, agitação instantânea, possibilidade de variação da área de superfície da membrana, e, também, compatibilidade com os aparelhos de agitação comumente utilizados em laboratório.

BRONAUGH et al. (1981) verificaram a absorção percutânea da N-nitrodietanolamina (impureza presente em produtos cosméticos) empregando uma célula de difusão semelhante à de FRANZ. Neste estudo os autores utilizaram três veículos diferentes e pele humana dissecada.

O aparelho projetado por OLSZEWSKI e KUBIS (1969) para estudo da liberação de princípios ativos contidos em bases de pomadas permitiu o acompanhamento do processo de liberação continuamente, pois este era provido de um sistema de coleta de fração. Os testes realizados com pomadas contendo sulfatiazol mostraram-se adequados, apresentando resultados com boa reprodutibilidade.

KNECZKE et al. (1986) utilizaram uma célula de difusão estática para o estudo da liberação do ácido salicílico em vaselina sólida. Através deste estudo foi possível obter informações sobre a influência da concentração de ácido salicílico, bem como da viscosidade e da cristalinidade daquele veículo, na liberação do fármaco em questão.

Uma interessante célula de difusão automatizada foi projetada por ROLLAND et al. (1992) para estudar a influência da formulação, solução receptora, e oclusão na liberação *in vitro* de fármacos contidos em formas farmacêuticas de uso tópico. O sistema era provido de bomba peristáltica, através da qual a solução receptora era constantemente bombeada para um detector e retornava para o compartimento receptor. Um sistema de fluxo diferente foi adaptado a uma célula de difusão proposta por BRONAUGH e STEWART (1985), onde a solução receptora entrava em contato com a membrana de difusão através de perfusão, e as diversas amostras eram obtidas por meio de coletor de fração.

SCHEUPLEIN et al. (1969) estudaram os mecanismos de absorção percutânea por meio de uma pequena célula de difusão, a qual era composta por duas metades unidas por meio de uma presilha. Essas duas metades ficavam separadas por um disco perfurado que suportava uma membrana epidermal. Por meio deste aparelho, os autores verificaram a permeabilidade do estrato córneo a álcoois de diferentes pesos moleculares.

Um simples equipamento para estudo de liberação em sistema estático foi projetado por TURAKKA et al. (1983). Tal aparelho consistia de um bquer onde era colocada a solução receptora. Uma membrana de diálise era presa em uma das extremidades de um cilindro de vidro e inserida no bquer para que a membrana ficasse em contato com a fase receptora. O sistema todo era mantido a 37°C e as amostras coletadas periodicamente para posterior análise da quantidade de fármaco liberada.

A avaliação da cinética de absorção cutânea *in vitro*, considerando a viabilidade e o metabolismo da pele, pôde ser efetuada através de interessante e complexo aparelho construído por HOLLAND et al. (1984). Neste equipamento as condições bioquímicas de uma membrana natural (pele dissecada de camundongo) foram mantidas por meio de fluxo de meio estéril, o qual era gaseificado com 95 % de oxigênio e 5 % de dióxido de carbono. Nestas condições os autores verificaram a permeação cutânea do benzopireno, bem como, o metabolismo cutâneo deste composto.

3.5.3 Membranas utilizadas nos estudos de liberação *in vitro* de princípios ativos contidos em produtos dermatológicos

Alguns experimentos de liberação *in vitro* são conduzidos na ausência de membrana e constituem, basicamente, na verificação da cinética de liberação de um fármaco presente em uma formulação para uma fase imiscível, a qual supõe possuir propriedades semelhantes às da pele. As limitações desses métodos recaem no fato de que não são consideradas as complexidades anatômicas, biológicas e físico-químicas da pele humana. BUSSE et al. (1969) estudaram a liberação do 17-valerato de betametasona contido em pomadas, utilizando um sistema com uma fase oleosa líquida (a pomada) contendo o corticosteróide, flutuando sobre uma solução hidroalcoólica, representando a pele. Abaixo dessa solução estava uma fase

clorofórmica que simulava a circulação sanguínea. As três camadas eram agitadas e a quantidade de corticosteróide liberada dosada na fase clorofórmica.

Os estudos de liberação *in vitro* se aproximam mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas. Devido às amostras de pele humana serem de difícil obtenção e variarem quanto a sua permeabilidade, muitos pesquisadores usam outros materiais para simulá-la. A membrana de acetato de celulose tem sido utilizada como uma membrana com características hidrófilas em células de difusão para estudos de liberação *in vitro*. TURAKKA et al. (1983) verificaram a influência de diversos tensoativos na liberação dos ácidos *orto*-, *meta*-, e *para*-hidroxibenzóicos contidos em bases triglicérides, utilizando uma membrana de éster de celulose em uma célula de difusão.

Um estudo comparativo da liberação do ácido salicílico de uma microemulsão e de emulsão A/O, foi realizado por STUPAR et al. (1986). Foi observada a influência do tipo de membrana na quantidade de ácido salicílico liberada. Atingiu-se uma maior liberação quando uma membrana lipófila (nitrato de celulose) foi empregada, e, uma menor liberação quando se associou tal membrana com outra de celulose regenerada.

SHAH et al. (1992b) utilizaram uma membrana composta por uma mistura de ésteres de celulose (acetato e nitrato de celulose) no estudo de liberação *in vitro* de cremes contendo 17-valerato de betametasona. O fluxo da liberação deste fármaco através da membrana foi calculado, e as curvas de liberação em regressão linear apresentaram ótimos coeficientes de correlação.

No estudo da liberação da prednisona, a partir de microemulsões O/A, GASCO et al. (1988) empregaram membrana hidrófila impregnada com dodecanol. Esta membrana tratada foi pressionada sobre uma membrana hidrófila formando assim, um sistema com características hidrófilas e lipófilas.

Um sistema de membrana em multicamada foi projetado por NEUBERT et al. (1991) para ser empregado em estudos de penetração de fármacos na pele. O referido sistema funciona, segundo os autores, como receptor e pode simular a penetração de substâncias na pele humana dissecada.

As membranas de dimetil-polissiloxano têm sido extensamente utilizadas em estudos de transporte de fármacos por serem hidrófobas, de fácil preparo e permeação (BOTTARI et al., 1977; CAPPEL, KREUTER, 1991; GASCO, TROTTA,

CARLOTTI, 1982; KNECZKE, 1986; KUROSAKI et al., 1991; NEUBERT et al., 1991; ROLLAND et al., 1992).

KUROSAKI et al. (1991) realizaram um estudo comparativo da permeação do ácido flufenâmico em três modelos de membranas: pele abdominal de rato, membrana de silicone e estrato córneo isolado de pele de cobaia. Foi possível verificar que os modelos de membranas hidrófobas, como as de silicone, são inadequados para avaliar o aumento da permeação cutânea de fármacos a partir de formas farmacêuticas contendo veículos que atuam no estrato córneo.

HATANAKA et al. (1992) desenvolveram um sistema de membrana artificial composto por membrana de silicone e de poli-(2-hidroxietilmetacrilato), para estudos *in vitro* da permeabilidade cutânea de fármacos. Foi determinada a permeabilidade da membrana para vários fármacos, com diferentes propriedades físico-químicas e esta, comparada com a pele dissecada de rato sem pêlo. Os resultados obtidos mostraram que a membrana desenvolvida apresentou uma propriedade barreira similar ao modelo de pele animal utilizado.

Dentre as membranas de origem natural, a pele humana é insubstituível nos estudos de penetração e permeação cutânea. Entretanto, devido às dificuldades na aquisição destas membranas, as peles de animais, como ratos (BRONAUGH, STEWART, 1983; HADGRAFT, BEUTNER, WOLFF, 1993; MASINI et al., 1993; SATO, SUGIBAYASHI, MORIMOTO, 1991; SCOTT, WALKER, DUGARD, 1986), camundongos com e sem pêlo (BRONAUGH, STEWART, 1986; DURRHEIM et al., 1980; FLYNN, DURRHEIM, HIGUCHI, 1981; GHOSH, CHIAO, GOKHALE, 1993; HORI et al., 1991; OKAMOTO, HASHIDA, SEZAKE, 1991; REIFENRATH et al., 1984; SATO, SUGIBAYASHI & MORIMOTO, 1991), coelhos (DE VOS et al., 1991), cobaias e cricetos (KUROSAKI et al., 1991; OKAMOTO, HASHIDA, SEZAKE, 1991; SURBER, WILHELM, MAIBACH, 1991), porcos (REIFENRATH et al., 1984; SATO, SUGIBAYASHI, MORIMOTO, 1991), cães sem pêlo (REIFENRATH et al., 1984), macacos (SURBER, WILHELM, MAINBACH, 1991; WESTER, MAIBACH, 1976) tem sido empregadas como membranas naturais.

A pele humana pode ser obtida pela dissecação de cadáveres (BRONAUGH, CONGDON, SCHEUPLEIN, 1981; FRANZ, 1975; ROY, ROOS, SHARMA, 1994; SCHUMANN, 1991; SETHI, AGHA, 1993) ou cirúrgicas (MOLLGAARD, HOELGAARD, 1983). Vários procedimentos são utilizados no tratamento de

amostras de pele humana. SCHUMANN (1991) utilizou pele humana da região abdominal, obtida 24 horas *post mortem* e mantida em refrigerador por um período máximo de 12 horas. Foi possível verificar, por testes *in vitro*, que o butilhidroxianisol, adjuvante presente em várias formulações tópicas, penetra nas diversas camadas da pele. Foram considerados fatores como quantidade aplicada, área da pele exposta aos produtos, bem como metabolismo do referido fármaco na pele.

FRANZ (1975) obteve ótimas correlações entre os dados de absorção percutânea, obtidos por métodos *in vitro* e *in vivo*, de 12 compostos orgânicos. Segundo o autor, a utilização de amostras de pele humana armazenada em congelador, por um período de três meses, não alterou as características de permeabilidade desta membrana natural.

A penetração de substâncias em pele dissecada pode ser verificada utilizando somente a camada epidérmica. BRONAUGH et al. (1981) aqueceram amostras de pele abdominal humana, em água a 60°C, por alguns segundos, removeram a epiderme, e a utilizaram nos estudos *in vitro* de penetração percutânea da N-nitrodietanolamina, eventualmente contida em veículos cosméticos.

O limitado número de amostras de pele humana, bem como a deterioração da sua função barreira durante a armazenagem são fatores limitantes, durante a execução de numerosos experimentos. REGNIER et al. (1993) propuseram a obtenção de uma epiderme reconstituída a partir de queratinócitos humanos. As medidas da absorção percutânea do ácido benzóico, da testosterona e da hidrocortisona revelaram que, sob as mesmas condições experimentais, a epiderme reconstituída exibiu uma função barreira com propriedades qualitativas similares a da pele humana normal, ou seja, as substâncias hidrófilas penetram mais rapidamente do que as hidrófobas.

No sentido de verificar a validade dos resultados *in vitro* de absorção percutânea, através da pele humana e em vários modelos animais, PRIBORSKY e MUHLBACHOVÁ (1990) realizaram um estudo comparativo com pele de rato, cobaias, coelho, porco, camundongo e pele humana. A absorção percutânea de soluções de erioglaucina (Azul Brilhante) foi verificada em todas essas amostras de pele, sendo que o modelo animal que mais se aproximou à pele humana foi a cobaia.

WESTER e MAIBACH (1989) encontraram boa correlação nos dados de absorção percutânea do ácido benzóico, da testosterona e da hidrocortisona em experimentos *in vivo* com macaco Rhesus e com humanos.

A pele de camundongo sem pêlo foi empregada em alguns estudos e apresentou-se adequada para substituir a pele humana (DURRHEIM et al., 1980). No entanto, a utilização de pele de camundongo sem pêlo em estudos *in vitro* de absorção cutânea, deve ser feita de maneira cautelosa, uma vez que, este tecido parece ser susceptível a algumas alterações quando comparados com a pele de cadáver humano. O aumento da permeabilidade da camada córnea da pele desses animais pode ocorrer devido à excessiva hidratação, ao tratamento com acetona e com promotores de penetração (BARRY, 1987).

Em extenso estudo realizado por BONAUGH et al. (1982) foram determinadas as características de pele humana e de diferentes espécies de animais, tais como espessura das camadas da pele, densidade e tamanho dos folículos pilosos, e constante de permeabilidade a diferentes compostos. Os autores concluíram através dos dados obtidos e da literatura, que a escolha do modelo animal é dependente das características físico-químicas da substância que se pretende verificar a absorção percutânea.

Alguns autores estudaram o uso de pele de cobra (*Elaphe obsoleta*) como modelo de membrana natural para estudos de permeação. A facilidade de obtenção desta pele e o fato de não ser necessário sacrificar o animal são fatores vantajosos em relação à pele de cadáveres humanos (TORUAN-PURBA, TABIBI, MENDES, 1993).

3.5.4 Soluções receptoras utilizadas nos testes *in vitro*

A escolha da solução receptora colocada nas células de difusão *in vitro* deve ser feita criteriosamente, objetivando garantir o sucesso do experimento. Em muitos estudos, prefere-se a solução isotônica tamponada a pH 7,4 como fase receptora (CHOWHAN, PRITCHARD, 1975; MICHNIAK, CHAPMAN, SEYDA, 1993; SASAKI et al., 1991). Entretanto, sempre é necessário garantir “sink conditions”, ou seja, atividade termodinâmica do fármaco no fluido receptor não deve exceder 10 % da sua solubilidade de saturação para, assim, ser garantida uma permeação favorável, e, assegurar uma eficiente coleta do permeante (WESTER, MAIBACH, 1989).

Substâncias hidrófobas, que podem ser definidas como substâncias com baixa solubilidade em água, solúveis em solventes orgânicos e com altos valores de coeficiente de partição O/A, apresentam uma dificuldade em se partilhar para um meio receptor aquoso. Assim, o uso de meios não aquosos ou tampões isotônicos contendo solubilizantes parece ser uma alternativa.

BRONAUGH e STEWART (1983) verificaram a absorção cutânea de dois princípios aromáticos de natureza hidrófoba através de metodologia *in vitro*. Soluções receptoras lipófilas substituíram a solução fisiológica, objetivando tentar melhorar a absorção e aproximar com os resultados obtidos *in vivo*. Assim, o soro de coelho e diluições aquosas de albumina de soro bovino, solventes orgânicos e quatro tensoativos não iônicos, foram empregados como solução receptora. A solução aquosa de polietilenoglicol-20-oleil-éter a 6 %, foi a que apresentou melhores resultados, uma vez que os seguintes fatores foram associados: boa correlação com o teste *in vivo*, e, pequena danificação na membrana (pele dissecada de rato) usada no teste *in vitro*.

A solubilidade do fármaco na solução receptora e o fato desta não alterar a forma farmacêutica por difusão através da membrana, foram os fatores que ROLLAND et al. (1992) levaram em consideração na escolha da solução receptora em seus experimentos. Foi empregada uma substância lipófila (derivado do ácido naftóico), uma membrana de silicone, duas fases receptoras (*n*-octanol e solução aquosa de Polissorbato 80 a 0,25 %), bem como quatro bases tópicas. A solução aquosa de tensoativo apresentou-se mais adequada, uma vez que o *n*-octanol atravessou a membrana e dissolveu algumas das formas farmacêuticas utilizadas.

SUBER et al. (1991) verificaram que a adição de 3 % de polietilenoglicol 20 ou 3 % de albumina, na fase receptora, aumentou o fluxo da acitretina através da pele de macaco nos experimentos *in vitro*.

No sentido de aproximar os resultados *in vitro* com as situações *in vivo*, SCOTT e RAMSEY (1987) testaram diferentes soluções receptoras para avaliar *in vitro*, a absorção percutânea através da pele de rato de um inseticida piretróide. As soluções aquosas de etanol a 50 % de polietilenoglicol-20 cetiléter (Cetomacrogol 1000) a 6 % e soro de carneiro, apresentaram-se adequadas para o estudo.

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O conceito de validação apareceu pela primeira vez na revisão das Boas Práticas de Fabricação (BPF), pelo FDA, em 1976, com o objetivo de adequar os requerimentos visando a garantia da qualidade.

A validação objetiva garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, é fundamental que os equipamentos e materiais estejam calibrados e os analistas devidamente qualificados e treinados (ICH, 1995). Leite (2002) descreveu que o objeto da validação é desafiar o método e determinar limites de variabilidade permitida para as condições requeridas para o método.

Segundo CHASIN et al. (1998), o desenvolvimento de um método analítico envolve a definição das características e requerimentos que um método deve satisfazer, a definição dos parâmetros de adequação que garantem a boa performance do sistema durante as análises e a validação, que permite conhecer a confiabilidade do método.

É importante destacar que não há um método único para efetuar a validação. A grande variedade de substâncias, aliada às suas complexidades e a diversidade de métodos, tornam impossível estabelecer um sistema de validação universal. Portanto, é importante um bom planejamento onde sejam avaliados os requerimentos legais e o método analítico escolhido (CHASIN et al., 1998).

Os parâmetros analíticos típicos considerados em um processo de validação são: precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de trabalho, reprodutibilidade, robustez e sensibilidade (GREEN, 1996).

Considerando a grande variedade de métodos analíticos, diferentes esquemas de validação são requeridos (USP, 1999) (Tabela 1).

- Categoria I – métodos analíticos para determinação quantitativa das matérias-primas ou dos princípios ativos nas especialidades farmacêuticas.
- Categoria II – métodos analíticos para determinação de impurezas em matérias-primas ou produtos de degradação em especialidades farmacêuticas. Incluem-se aqui determinação quantitativa e ensaios limites.

- Categoria III – métodos analíticos para determinação de características de performance.
- Categoria IV – testes de identificação.

Tabela 1 – Elementos necessários para a validação.

CATEGORIA II					
PARÂMETROS VERIFICADOS	CATEGORIA I	QUANTITATIVOS	ENSAIOS LIMITES	CATEGORIA III	CATEGORIA IV
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Faixa de trabalho	Sim	Sim	*	*	Não

FONTE: USP, 1999.

NOTA: * Pode ser necessário conforme a natureza do teste.

3.6.1 Exatidão

O parâmetro exatidão pode ser definido como o grau de concordância entre os resultados encontrados e o valor verdadeiro, e é calculado como porcentagem de recuperação da quantidade incorporada (USP, 1999).

A determinação da exatidão em um doseamento de matéria-prima pode ser feita pela aplicação do método analítico a um analito de pureza conhecida ou comparando o resultado com aquele de um segundo método bem caracterizado (USP, 1999).

No caso de produto acabado, pode-se incorporar quantidades conhecidas do produto à sua matriz (placebo). Quando não é possível obter-se um placebo (matriz sem analito), pode-se adicionar quantidades conhecidas do analito em uma matriz que já contenha alguma quantidade do fármaco. Pode-se também comparar os resultados com aqueles de um método cuja exatidão tenha sido previamente

determinada. Para um doseamento, deve-se incorporar, 50, 75, 100, 125 e 150 % da concentração utilizada em um doseamento normal (LEITE, 2002).

Para impurezas, deve-se incorporar quantidades conhecidas do produto a ser determinado. Recomenda-se realizar os testes para determinação da exatidão em 3 concentrações diferentes com 3 replicatas cada (USP, 2000; LEITE, 2002).

3.6.2 Precisão

SHAP (2000), descreve a precisão como o grau de concordância entre os resultados de análise individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, sendo geralmente expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo dos resultados obtidos.

A precisão pode ser dividida em 3 tipos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é a precisão de um método medida nas mesmas condições de operação em um curto período de tempo, por exemplo, múltiplas medidas de uma mesma amostra por um mesmo analista. A precisão intermediária é a concordância de resultados quando um mesmo método é aplicado muitas vezes dentro de um mesmo laboratório, em diferentes dias, por diferentes analistas. A reprodutibilidade, por sua vez, examina o grau de concordância dos resultados originados de análises em diferentes laboratórios (CHASIN et al., 1998).

3.6.3 Especificidade

SHAP (2000) define especificidade como a habilidade do método de analisar a substância de interesse, em presença de outras substâncias, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, sem que estas interfiram no resultado. Assegurar a especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método (LEITE, 2002).

A especificidade pode ser avaliada incorporando a matéria-prima ou produto acabado em exame com níveis apropriados de impureza ou excipientes e demonstrando que o resultado não é afetado pela presença destes compostos. Outra maneira é comparar os resultados do teste com aquele de um segundo método validado e bem caracterizado.

3.6.4 Limite de detecção

A ICH (1995) conceitua o limite de detecção como a menor concentração do analito que produz uma resposta mensurável.

Para métodos não-instrumentais, o limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas, estabelecendo o nível mínimo no qual o analito pode ser seguramente detectado (USP, 1999).

Para métodos cromatográficos, o limite de detecção corresponde à concentração cujo pico é duas a três vezes maior que o ruído observado no cromatograma (LEITE, 2002).

3.6.5 Limite de quantificação

GREEN (1996), define o parâmetro limite de quantificação como a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições normais de trabalho, sendo expresso como a concentração da substância na amostra (por exemplo, ppm, ppb).

O limite de quantificação pode ser determinado para métodos não-instrumentais analisando amostras com concentrações conhecidas do analito e estabelecendo o nível mínimo no qual este pode ser quantificado com exatidão e precisão. Para métodos cromatográficos, o limite de quantificação pode ser definido como aquela concentração onde o pico é 10 vezes maior que o ruído observado (USP, 2000).

3.6.6 Linearidade e faixa de trabalho

O parâmetro linearidade é demonstrado quando os resultados de um teste são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração da substância em exame (GREEN, 1996).

A faixa de trabalho é o intervalo entre a maior e a menor concentração do analito (incluindo estes valores) que demonstram ser determinados com adequados níveis de precisão, exatidão e linearidade (USP, 1999).

A linearidade pode ser determinada, inicialmente por uma análise visual após plotar as respostas obtidas como função da concentração do analito. Se ocorrer uma relação linear, o resultado deve ser estabelecido por um método adequado (USP, 1999). A inclinação da reta, o intercepto e o coeficiente de correlação são, então

determinados. Valores de coeficiente de correlação de cerca de 0,98 são aceitáveis para um método (LEITE, 2002).

A faixa de trabalho, por sua vez, pode ser determinada verificando se o método origina precisão, exatidão e linearidade quando aplicado a amostras do analito no extremo e dentro da faixa (USP, 1999).

Para o doseamento de um fármaco, a linearidade deve ser testada nas concentrações de 80 a 120 % da concentração de trabalho. Para uniformidade de conteúdo deve-se avaliar a linearidade na faixa de 70 a 130 % da concentração teórica e para impureza, de 50 a 120 % do valor especificado (USP, 1999).

3.6.7 Robustez

É a habilidade do resultado de um método permanecer inalterado por pequenas mudanças de parâmetros operacionais e ambientais. A robustez pode ser determinada através da análise individual ou simultânea dos parâmetros mais sujeitos à variação (ICH, 1995).

3.6.8 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é utilizada como um parâmetro comparativo entre dois métodos, onde o método com maior sensibilidade apresenta curva padrão com maior inclinação (ICH, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas nas formulações atendiam a especificação de grau farmacêutico e os reagentes e solventes eram todos P. A..

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-Primas e Reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA –Na₂)

Ácido kójico – padrão – Sigma Aldrich Chem. Co.

Ácido kójico (98 a 102 %) – matéria-prima SP-Farma

Álcool etílico

Butilhidroxitolueno (BHT)

Cera auto emulsionante não iônica – Emulgade Wax[®]

Cera auto emulsionante não iônica – Polawax[®]

Cloreto férrico (FeCl₃)

Triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico – Crodamol GTCC[®]

Diestearato de macrogol 150 – Cutina DSP 6B[®]

Dipropilenoglicol

Hidroxietilcelulose – Natrosol[®]

Metanol

Metilparabeno – Nipagin[®]

Solução de acetato de sódio 2 M

Solução de ácido acético 2 M

Solução de ácido clorídrico 0,1 M

Solução de cloreto de potássio 0,2 M

Solução de fosfato de potássio 0,1 M

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

4.1.2 Equipamentos

Aparelho de ponto de fusão - Quimis

Balança analítica – Mettler Toledo - AG 245

Banho Maria – Nova Técnica

Câmera fotográfica - kodak

Centrífuga 5000 rpm – Excelsa Baby - Fanem

Célula para estudos de permeação cutânea *in vitro*

Embalagem primária: potes plásticos de polietileno com parede dupla

Espectrofotômetro – UV-visível Shimadzu – UV 1601

Espectrômetro – IV- Perking Elmer

Estufa para secagem de material – De Leo

Filme fotográfico – Kodak ASA 400

Material de acondicionamento – frascos de vidros e potes plásticos

Potenciômetro digital – PG 2000 – Gehaka

Ultra-som – Elma – Transsonic 460/H

Ultra Turrax - Ika

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento da Forma Farmacêutica

Foram preparadas emulsões O/A não iônicas, com espessantes graxos e poliméricos. Na elaboração destas formulações as fases aquosas e oleosas foram aquecidas a 75°C, separadamente, sendo o espessante polimérico dispersado previamente na fase aquosa e, posteriormente, as fases foram emulsificadas, sob agitação. Durante o resfriamento efetuou-se uma etapa de homogeneização, cuidando-se para que a emulsão mantivesse um movimento constante evitando a formação do “cone de agitação” e aeração.

Na tabela 2 estão listadas as formulações, numeradas de F 1 a F 10, que foram previamente avaliadas por suas características organolépticas.

Tabela 2. Formula das emulsões O/A não iônicas.

MATÉRIA-PRIMA	FORMULAÇÕES									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Água deionizada	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Natrozol 250 HHR [®]	-	-	-	0,2%	0,5%	-	-	-	0,2%	0,5%
Propilenoglicol	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%	8,0%
Nipagin [®]	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Crodamol GTCC [®]	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Cutina DSP 6B [®]	-	5%	10%	-	-	-	5%	10%	-	-
Polawax GP 200 [®]	-	-	-	-	-	15%	15%	15%	15%	15%
Emulgade Wax [®]	15%	15%	15%	15%	15%	-	-	-	-	-
EDTA dissódico	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
BHT	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%

FONTE: O AUTOR

4.2.2 Avaliação das Características Organolépticas dos Veículos

As formulações F 1 a F 10, da Tabela 2 foram submetidas a avaliações das suas características organolépticas e valores de pH após 24 horas em repouso.

As características organolépticas observadas foram: aspecto, cor, odor, homogeneidade.

As determinações de pH foram efetuadas em potenciômetro digital.

4.2.3 Avaliação Preliminar da Estabilidade da Formulação Escolhida

A formulação selecionada, em função dos parâmetros organolépticos, foi submetida aos ensaios de estabilidade. Após repouso de 48 horas (T_{zero}), foi submetida às seguintes condições:

- ciclo de resfriamento (2°C/24horas) e de aquecimento (40°C/24horas), por três vezes consecutivos.
- estufa a 40°C/24 horas.
- centrifugação a 4000 rpm/30min.

Ao término dos ensaios acima citados, foram observadas: características organolépticas – aspecto, cor, odor, homogeneidade e valores de pH.

4.2.4 Espectrofotometria no Ultravioleta

Os espectros de absorção do ácido kójico (solução aquosa 25 µg/ml) e do metilparabeno, Nipagin®, (solução aquosa 25 µg/ml) foram obtidos em espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu – UV 1601 na faixa de 200 a 400 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura e água como branco, para ajuste do zero do aparelho antes da leitura da amostra. O experimento foi realizado à temperatura ambiente.

4.2.4.1 Curva padrão do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta

A curva padrão foi construída com cinco pontos. Foram feitas 3 pesagens, em dias diferentes, para o preparo da solução padrão concentrada (25 mg/100 ml) e estas soluções foram diluídas em triplicata (n = 9). As soluções finais tinham concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml.

As leituras das absorvâncias foram feitas no comprimento de onda de 269 nm, utilizando-se água como branco. A curva foi construída graficamente relacionando os valores de absorvância obtidos em função da concentração das soluções. O valor do coeficiente de correlação (r) e a equação da reta foram determinados, por meio dos mínimos quadrados. Os valores de DPR em cada ponto da curva foram calculados aplicando-se as equações indicadas a seguir:

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / n - 1} \quad \text{DPR} = S \cdot 100\% / \bar{X}$$

onde:

n = número de amostras

S = desvio padrão

X_i = valor de cada unidade testada

\bar{X} = média dos valores testados

4.2.4.2 Linearidade

A curva padrão para determinar a linearidade do método de doseamento do ácido kójico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi construída com 19

pontos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g/ml}$). Foram feitas duas pesagens, em dias diferentes, para o preparo da solução padrão de ácido kójico concentrada (25 mg/100 ml). Estas soluções foram diluídas em triplicata, obtendo-se seis soluções para cada ponto ($n = 6$).

4.2.4.3 Robustez

Para determinar se o método de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta apresenta robustez foram analisados três parâmetros: influência do pH, da temperatura e do tempo de leitura.

4.2.4.3.1 Influência do pH

A partir de uma solução padrão de 25 mg/100 ml de ácido kójico, foram obtidas 10 soluções a 20 $\mu\text{g/ml}$ cada, em diferentes valores de pH (Tabela 3).

Os diferentes valores de pH foram obtidos utilizando as soluções tampão mostradas na tabela 4.

Neste experimento foram preparadas três soluções iniciais e as leituras foram realizadas em triplicata, obtendo-se um $n=9$. A leitura das absorvâncias foi realizada a 269 nm, em temperatura de 20°C e utilizando como branco a solução tampão correspondente isenta de ácido kójico.

Tabela 3. Soluções padrão de ácido kójico 20 $\mu\text{g/ml}$ em diferentes valores de pH.

SOLUÇÕES	VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO CONCENTRADA (ml)	VOLUME DAS SOLUÇÕES TAMPÃO (ml)	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)	pH DA SOLUÇÃO
1	4,0	46,0	20,0	1
2	4,0	46,0	20,0	2
3	4,0	46,0	20,0	3
4	4,0	46,0	20,0	4
5	4,0	46,0	20,0	5
6	4,0	46,0	20,0	6
7	4,0	46,0	20,0	7
8	4,0	46,0	20,0	8
9	4,0	46,0	20,0	9
10	4,0	46,0	20,0	10

FONTE: O AUTOR

Tabela 4. Soluções tampão.

pH	Solução Tampão Utilizada
1	- Clark-Eubs (KCl-HCl)
2	- Clark-Eubs (KCl-HCl)
3	- McLLavaine (Na_2HPO_4 – NaOH)
4	- McLLavaine (Na_2HPO_4 – NaOH)
5	- McLLavaine (Na_2HPO_4 – NaOH)
6	- Sörensen (Na_2HPO_4 – KH_2PO_4)
7	- Sörensen (Na_2HPO_4 – KH_2PO_4)
8	- Sörensen (Na_2HPO_4 – KH_2PO_4)
9	- H_3BO_3 . KCl – NaOH
10	- H_3BO_3 . KCl – NaOH

Foram preparadas soluções de ácido kójico com concentração final de 25 $\mu\text{g/ml}$ em tampão acetato (pH 3,0), em água (pH 6,0) e em tampão H_3BO_3 . KCl – NaOH (pH 9,0). Os espectros destas soluções foram obtidos em espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu – UV 1601 na faixa de 200 a 400 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de espessura e utilizando como branco as respectivas soluções tampão isentas de ácido kójico.

4.2.4.3.2 Influência do tempo de leitura

A partir de uma solução padrão de ácido kójico (25 mg/100 ml) foram obtidas soluções aquosas (pH 6,0) de 10 $\mu\text{g/ml}$ cada. Neste experimento foram preparadas três soluções iniciais e as leituras foram feitas em triplicata (n=9).

A leitura das absorvâncias foi realizada a 269 nm, em temperatura de 20°C, nos tempos zero, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8 horas após o preparo das soluções.

4.2.4.3.3 Influência da temperatura

A partir de uma solução padrão de ácido kójico (25 mg/100 ml) foram obtidas soluções aquosas (pH 6,0) de 10 µg/ml cada. Neste experimento foram preparadas três soluções iniciais e as leituras foram feitas em triplicata (n=9).

A leitura das absorvâncias foi realizada a 269 nm, logo após o preparo nas temperaturas de 5°C, 20°C e 35°C.

4.2.4.4 Exatidão

Foi preparada, em triplicata, solução padrão de ácido kójico na concentração de 20 µg/ml.

Ao veículo (formulação F 4), isento de conservante, foi incorporado ácido kójico padrão, para a obtenção de amostras de emulsão contendo 0,5 %; 1 %; e 2 % do ativo.

Uma tomada de amostra de 1 g de cada preparação foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado com água. Estas soluções foram filtradas em papel de filtro qualitativo, desprezando os primeiros 5 ml. Uma fração de cada um dos filtrados foi diluída com água até obter solução de concentração de 20 µg/ml.

A concentração do ácido kójico foi determinada por espectrofotometria no ultravioleta como já descrito e foi calculada a porcentagem de recuperação do método. Este experimento foi realizado em triplicata (n = 9).

4.2.4.5 Precisão

Para verificação da precisão intradia foram preparadas soluções de ácido kójico nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml. A leitura das absorvâncias foi realizada a 269 nm e foi calculado o DPR com os resultados obtidos. Este experimento foi realizado em triplicata (n = 3).

Para verificação da precisão intermediária foram preparadas soluções de ácido kójico, em dois dias diferentes, nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml. A leitura das absorvâncias foi realizada a 269 nm, em dias diferentes, em aparelhos diferentes e por analistas diferentes e foi calculado o DPR com os resultados obtidos. Este experimento foi realizado em triplicata (n = 6).

4.2.5 Espectrofotometria no Visível pelo Cloreto Férrico

4.2.5.1 Determinação da influência da concentração de cloreto férrico na intensidade de cor na solução com ácido kójico.

Foram preparados 32 sistemas, com volume final de 10 ml, contendo todos 1 ml da solução padrão de ácido kójico 0,1 mg/ml, e variando a concentração de cloreto férrico no sistema, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Sistemas utilizados para determinação da influência da concentração de cloreto férrico na intensidade de cor na solução com ácido kójico.

Solução de ácido kójico padrão 100 µg/ml (ml)	Solução de Cloreto Férrico 4,5 mg/ml (ml)	Água Deionizada (ml)	Volume final do sistema (ml)	Concentração de Cloreto Férrico (µg/ml)
1,0	0,2	8,8	10	90
1,0	0,4	8,6	10	180
1,0	0,6	8,4	10	270
1,0	0,8	8,2	10	360
1,0	1,0	8,0	10	450
1,0	1,2	7,8	10	540
1,0	1,4	7,6	10	630
1,0	1,6	7,4	10	720
1,0	1,8	7,2	10	810
1,0	2,0	7,0	10	900
1,0	2,2	6,8	10	990
1,0	2,4	6,6	10	1080
1,0	2,6	6,4	10	1160
1,0	2,8	6,2	10	1260
1,0	3,0	6,0	10	1350
1,0	4,0	5,0	10	1800
1,0	4,2	4,8	10	1890
1,0	4,4	4,6	10	1980
1,0	4,6	4,4	10	2070
1,0	4,8	4,2	10	2160
1,0	5,0	4,0	10	2250
1,0	5,2	3,8	10	2340
1,0	5,4	3,6	10	2430
1,0	5,6	3,4	10	2520
1,0	5,8	3,2	10	2610
1,0	6,0	3,0	10	2700
1,0	6,2	2,8	10	2790
1,0	6,4	2,6	10	2880
1,0	6,6	2,4	10	2970
1,0	6,8	2,2	10	3060
1,0	7,0	2,0	10	3150
1,0	7,2	1,8	10	3240

FONTE: O AUTOR

As absorvâncias destes sistemas foram determinadas por espectrofotometria em 503 nm, à temperatura ambiente, utilizando como branco sistemas com iguais concentrações de cloreto férrico e isentos de ácido kójico. Os valores de absorvâncias obtidos em função da concentração de cloreto férrico foram representados graficamente.

4.2.5.2 Espectro de absorção do ácido kójico em presença de cloreto férrico.

Para o sistema, com volume final de 10 ml, contendo 2,5 ml da solução padrão de ácido kójico (0,2 mg/ml), 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e 1,5 ml de água deionizada (pH 5,8) e para o sistema contendo 2,5 ml da solução de metilparabeno, Nipagin[®] (0,2 mg/ml), 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e 1,5 ml de água deionizada foram traçados espectros de absorção em espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu - UV 1601 na faixa de 200 a 800 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de espessura. Como branco foram utilizados sistemas com iguais concentrações de cloreto férrico, isentos de ácido kójico e metilparabeno.

4.2.5.3 Curva padrão do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

A curva padrão foi construída com seis pontos. A partir de uma solução padrão de ácido kójico de 100 µg/ml foram elaborados sistemas, com volumes finais de 10 ml, contendo 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e concentrações de ácido kójico de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/ml, conforme mostra a tabela 6. Os sistemas foram preparados em triplicata.

Tabela 6. Preparo dos sistemas para obtenção da curva padrão do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO PADRÃO 100 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	SOLUÇÃO DE CLORETO FÉRRICO 4,5 mg/ml (ml)	ÁGUA DEIONIZADA (ml)	CONCENTRAÇÃO FINAL $\mu\text{g/ml}$
0,5	6,0	3,5	5
1,0	6,0	3,0	10
1,5	6,0	2,5	15
2,0	6,0	2,0	20
2,5	6,0	1,5	25
3,0	6,0	1,0	30

FONTE: O AUTOR

As leituras das absorvâncias foram feitas, em triplicata ($n = 9$) em comprimento de onda de 503 nm, utilizando-se como branco um sistema com igual concentração de cloreto férrico isento de ácido kójico. O resultado foi representado graficamente e foram determinados o valor do coeficiente de correlação (r) e a equação da reta, por meio dos mínimos quadrados. Os valores de DPR foram calculados para cada ponto da curva.

4.2.5.4 Linearidade

Para avaliação da linearidade do método de doseamento do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico foi construída uma curva padrão com 15 pontos (1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g/ml}$). Foram feitas duas pesagens, em dias diferentes, para o preparo da solução padrão de ácido kójico 0,1 mg/ml. Em tubos de ensaio contendo 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) recém preparada foram acrescentados diferentes volumes da solução padrão de ácido kójico e água, obtendo-se sistemas com volume final de 10 ml. Estes sistemas foram preparados em triplicata, obtendo-se seis soluções para cada ponto ($n = 6$).

4.2.5.5 Robustez

Para determinar se o método de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico apresenta robustez foram analisados três parâmetros: influência do pH, da temperatura e do tempo de leitura.

4.2.5.5.1 Influência do pH

Foram preparados, em triplicata, sistemas contendo 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml), 1 ml de solução padrão de ácido kójico (200 µg/ml) e 3 ml de uma das diferentes soluções (água deionizada, HCl 0,1M, tampão acetato pH 4,0) resultando em soluções de diferentes valores de pH, conforme mostra a tabela 7.

A leitura das absorvâncias foi realizada em 503 nm, a temperatura de 20°C, utilizando como brancos sistemas idênticos isentos de ácido kójico. Foram calculados os valores de DPR para os valores de absorvância dos diferentes valores de pH.

Tabela 7. Preparo dos sistemas para verificação da influência do pH na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

SOLUÇÃO DE CLORETO FÉRRICO 4,5 mg/ml (ml)	SOLUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO 200 µg/ml (ml)	ÁGUA DEIONIZADA (ml)	ÁCIDO CLORÍDRICO 0,1 M (ml)	TAMPÃO ACETATO pH 4,0 (ml)	PH FINAL
6,0	1,0	-	3,0	-	2,0
6,0	1,0	-	-	3,0	3,0
6,0	1,0	3,0	-	-	5,8

FONTE: O AUTOR

4.2.5.5.2 Influência do tempo de leitura

Foram feitas 3 pesagens para o preparo da solução padrão de ácido kójico 100 µg/ml e a partir destas foram preparados nove sistemas (n = 9), sendo que cada sistema continha 2 ml da solução de ácido kójico, 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e 2 ml de água deionizada.

A leitura das absorvâncias foi realizada em 503 nm, a temperatura de 20°C, logo após o preparo dos sistemas e em intervalos de 1 hora até completar o período de 8 horas. Como branco foi utilizado um sistema idêntico isento de ácido kójico.

4.2.5.5.3 Influência da temperatura

Foram feitas 3 pesagens para o preparo da solução de ácido kójico padrão 100 µg/ml e a partir destas foram preparados 9 sistemas (n=9), sendo que cada

sistema continha 2 ml da solução de ácido kójico, 6 ml da solução de cloreto férrico 4,5 mg/ml e 2 ml de água deionizada.

Três sistemas foram submetidos a banho-maria (35°C). Outros três sistemas foram submetidos a resfriamento em geladeira (5°C) e os três últimos sistemas ficaram a temperatura de 20°C em banho-maria.

A leitura das absorvâncias foi realizada em 503 nm, utilizando como branco um sistema idêntico isento de ácido kójico. O DPR foi calculado para cada temperatura.

4.2.5.6 Exatidão

Para controle positivo foi preparado um sistema contendo 2 ml da solução padrão de ácido kójico (100 µg/ml), 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e 2 ml de água deionizada.

Como branco foi preparado um sistema contendo 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e 4 ml de água deionizada.

Ao veículo (formulação F 4), isento de conservante, foi incorporado ácido kójico padrão, para a obtenção de amostras de emulsão contendo 0,5 %; 1 % e 2 % do ativo.

Uma tomada de amostra de 1 g de cada uma foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado com água. Estas soluções foram filtradas em papel de filtro qualitativo, desprezando os primeiros 5 ml. Uma fração de cada um dos filtrados foi adicionada a tubos contendo 6 ml da solução de cloreto férrico (4,5 mg/ml) e diferentes volumes de água até obter sistemas com concentração de 20 µg/ml de ácido kójico. O teor de ácido kójico foi determinado por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico, como já descrito, e foi calculada a porcentagem de recuperação do método.

4.2.5.7 Precisão

Foram preparados sistemas, em triplicatas, com concentrações finais de ácido kójico de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml, conforme mostra a Tabela 8. Como branco foi preparado um sistema isento de ácido kójico.

A leitura das absorvâncias foi realizada em 503 nm e foi calculado o DPR com os resultados obtidos (n = 3).

O procedimento foi efetuado num segundo dia ($n = 6$) e os resultados foram comparados.

Tabela 8. Preparo dos sistemas para determinação da precisão do método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico.

SISTEMA	SOLUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO 100 µg/ml (ml)	SOLUÇÃO DE CLORETO FÉRRICO 4,5 mg/ml (ml)	ÁGUA DEIONIZADA (ml)	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/ml)
1	0,5	6,0	3,5	5
2	1,0	6,0	3,0	10
3	1,5	6,0	2,5	15
4	2,0	6,0	2,0	20
5	2,5	6,0	1,5	25
Branco	0,0	6,0	4,0	0

FONTE: O AUTOR

4.2.6 Avaliação da Qualidade da Matéria-Prima

A matéria-prima foi submetida a ensaios quanto à identificação, solubilidade, características organolépticas, ponto de fusão e teor.

A identificação foi realizada por espectrometria no infravermelho e no ultravioleta e por ensaio de coloração com cloreto férrico.

A identificação por espectrometria no infravermelho foi realizada em espectrofotômetro IV – Perking Elmer. O espectro da matéria-prima foi comparado com o do padrão.

Para identificação por espectrofotometria no ultravioleta foi obtido espectro de solução aquosa de ácido kójico - matéria-prima na concentração de 25 µg/ml, conforme descrito no item 4.2.4. O espectro da matéria-prima foi comparado com o do padrão, obtido nas mesmas condições. Na identificação por ensaio de coloração com cloreto férrico foram preparados sistemas, com matéria-prima e padrão, com concentração final de 25 µg/ml. A coloração dos sistemas foi comparadas.

A solubilidade do ácido kójico foi avaliada em água, etanol 96%, acetona, éter, clorofórmio, HCl 0,1M e NaOH 0,1M segundo a classificação descrita na Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Os pontos de fusão da matéria-prima e padrão foram determinados em aparelho Quimis. As amostras foram colocadas em capilares e a temperatura foi determinada com termômetro, sendo realizadas três determinações.

A determinação do teor de ativo na matéria-prima foi obtida por espectrofotometria no ultravioleta e por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico, como já descrito. Estes ensaios foram realizados com quatro soluções (n=4).

4.2.7 Avaliação da Qualidade da Formulação F 4 com Ácido Kójico

A formulação F 4 contendo 2 % de ácido kójico foi submetida a ensaios quanto às características organolépticas, aspecto, pH, homogeneidade e teor.

As características organolépticas, o aspecto e a homogeneidade foram avaliados por meio da observação macroscópica do produto, depois de repouso de 48 horas após o preparo da formulação. O pH foi determinado em potenciômetro digital.

O teor da formulação foi obtido por espectrofotometria pelo método do cloreto férrico. Para este ensaio 1 g da formulação foi diluída com água em balão volumétrico (1:100). Esta solução foi homogeneizada e depois filtrada em papel de filtro qualitativo. A solução resultante foi utilizada para a obtenção do sistema com cloreto férrico, conforme item 4.2.5.2. A absorvância deste sistema foi determinada, em triplicata, a 503 nm.

4.2.8 Permeação Cutânea *In Vitro* do Ácido Kójico

4.2.8.1 Célula de difusão *in vitro*

A célula de difusão *in vitro* foi confeccionada em vidro PIREX, apresentando um compartimento receptor de 7 ml, uma área disponível para a difusão de $1,76625\text{ cm}^2$, com sistema de agitação magnético (Figura 6). O sistema de difusão é estático e acoplado a um banho-maria com circulação externa para a manutenção da temperatura do sistema.



Figura 6: Célula de difusão *in vitro* utilizada no presente trabalho.

4.2.8.2 Membrana

Foi empregada uma membrana natural (pele dissecada da orelha de porco) no estudo *in vitro* de permeação cutânea.

As membranas foram obtidas por dissecação da pele da orelha de porcos, após o sacrifício do animal. A superfície da pele foi limpa com algodão embebido em água deionizada, os pêlos foram cortados com tesoura e a pele foi retirada com auxílio de bisturi e pinça para dissecação. Em seguida foram removidos os tecidos subcutâneo e gorduroso presentes abaixo da derme, e certificou-se da integridade da pele. Foram selecionadas peles integras, ou seja, livres de qualquer tipo de lesão ou alterações (Figura 7). As amostras de pele dissecadas e integras foram embrulhadas em folhas de papel alumínio e filme plástico e depois congeladas. Quando necessárias essas amostras de pele foram descongeladas naturalmente à temperatura ambiente, e colocadas nas células de difusão *in vitro* para realização de ensaios de permeação.



Figura 7: Pele da orelha de porco em processo de dissecação.

4.2.8.3 Ensaio de permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico na formulação

A solução receptora, tampão fosfato isotônico pH 7,4, foi colocada no interior das células de difusão, evitando-se a formação de bolhas. Sobre a extremidade das células foram esticadas as membranas cuidando para que o lado inferior da derme ficasse em contato com a solução receptora. Ligou-se o banho-maria com circulação externa e quando a temperatura da célula foi equilibrada a 37°C, espalhou-se uniformemente sobre toda a área da membrana 2 g do produto formulado contendo 2 % de ácido kójico.

O sistema de agitação foi acionado e amostras de 1 ml da fase receptora foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos para a determinação do conteúdo de ácido kójico permeado. Para manter o volume constante, a cada coleta adicionou-se ao sistema 1 ml de solução receptora nova. O experimento foi realizado em triplicata e como controle foi realizado um branco contendo 2 g de formulação isenta de ácido kójico.

O teor de ácido kójico permeado foi determinado por espectrofotometria no ultravioleta (269 nm) a partir de uma curva padrão de ácido kójico em tampão fosfato isotônico pH 7,4 construída com 9 pontos (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml),

conforme o item 4.2.4.1. Para esta análise as aliquotas das soluções receptoras foram diluídas (1:5) com tampão fosfato isotônico pH 7,4.

Os dados de permeação cutânea foram utilizados para calcular os parâmetros cinéticos tempo de latência (tempo LAG) e fluxo (J) do ácido kójico através da membrana. Para determinar a cinética foram utilizados o modelo cinético de HIGUCHI (pseudo 1ª. ordem), o modelo cinético de 1ª. ordem e o modelo cinético de ordem zero. O modelo HIGUCHI (MICHNIAK, CHAPMAN, SEYDA, 1993) relaciona a quantidade de fármaco permeado por área versus a raiz quadrada do tempo, o modelo cinético de 1ª. ordem relaciona o log da quantidade de fármaco permeado por área versus o tempo e o modelo cinético de ordem zero relaciona a quantidade de fármaco permeado por área versus o tempo. O modelo que apresenta o coeficiente de correlação linear mais próximo de 1 corresponde ao modelo cinético da permeação do ativo. A interceptação no eixo das abscissas desta curva, em regressão linear, representa o tempo LAG em minutos. O fluxo (J) é dado pela inclinação da curva (ROY, ROOS, SHARMA, 1994). O parâmetro LAG foi expresso em minutos e J foi expresso em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$.

4.2.8.4 Ensaio de permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico em solução tampão fosfato isotônico pH 7,4

O ensaio foi realizado conforme descrito no item anterior, sendo que o produto formulado contendo ácido kójico foi substituído por 2 ml de uma solução tampão fosfato isotônica pH 7,4 com ácido kójico na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As amostras foram coletadas e analisadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos.

4.2.7.5 Determinação da Quantidade de Ácido Kójico Retido na Pele da Orelha de Porco

A extração do ácido kójico retido na pele animal foi baseada no método proposto por SASAKI et al. (1991) e TAUBER et al. (1976). Decorridas 12 horas de permeação *in vitro*, a pele da orelha de porco foi retirada do aparelho de difusão. A superfície da pele sobre a qual foi depositada a formulação foi limpa por meio de algodão embebido em metanol, para retirar o excesso de produto da pele. Após este procedimento recortou-se a área da pele exposta à difusão e em seguida foi pesada

e picotada. Os fragmentos obtidos foram transferidos para um tubo de plástico contendo 25 ml de metanol. Estes foram triturados em homogeneizador de tecidos (Ultraturex) até a total dilaceração da pele. A suspensão resultante foi submetida à sonicação em ultra-som de alta frequência durante 45 segundos, em intervalos de 15 segundos, para ocorrer o rompimento das células. O produto obtido foi filtrado em papel de filtro para um balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com metanol.

A quantidade de ácido kójico presente nesta solução foi determinada por espectrometria de absorção no ultravioleta (269 nm). Para esta quantificação foi feita uma curva padrão de ácido kójico em metanol nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 $\mu\text{g/ml}$, conforme item 4.2.4.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA

5.1.1 Emulsão

A escolha de um sistema adequado para incorporação dos princípios ativos é de fundamental importância para a estabilidade, para a disponibilidade no local de aplicação e, conseqüentemente, para a obtenção dos efeitos esperados. Aliados a estes fatores, deve-se levar em consideração que a aceitação da forma farmacêutica (emulsão) por parte do consumidor depende, principalmente, da sua eficácia e qualidades estéticas, além da sensação agradável. Se o consumidor não sentir bem-estar, dificilmente a usará por dias consecutivos interrompendo neste caso, o tratamento (CAMPOS, 1994).

Alguns veículos podem ser usados para obter as características físicas e químicas desejadas do produto ou para melhorar a aparência e as propriedades sensoriais (CAMPOS, 2001).

As emulsões são os veículos mais comuns de sistemas de liberação em produtos de uso tópico. Através delas é possível veicular uma ampla gama de substâncias que serão liberadas de maneira rápida e conveniente. As emulsões apresentam características distintas, condicionadas aos tipos de matérias incluídas tanto na fase oleosa quanto na fase aquosa, bem como a concentração de cada um deles e do emulsionante utilizado (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2000).

Além de atender as exigências do consumidor, as emulsões devem apresentar compatibilidade com o princípio ativo a ser incorporado. Para a veiculação do ácido fólico foi necessário o desenvolvimento de emulsões com bases não iônicas, pois estas são próprias para produtos com pH ácido (PALUDETTI, 1995). Em adição a isto, as bases não iônicas são em geral inócuas, não apresentando propriedades alergênicas e possuindo deste modo boa compatibilidade com a pele (CARMIN; KURAHASSI, 1995). As bases não iônicas escolhidas para obtenção das formulações são bases auto emulsionantes (Emulgate Wax[®] e Polawax[®]) que formam redes de cristais líquidos pela formação de uma série de bicamadas lamelares de moléculas de emulsificante ao redor das gotículas de óleo. Esta estrutura evita a coalescência das gotículas melhorando a estabilidade do produto, acredita-se que isso ocorra devido a redução a valores

bastante baixos das forças de atração de Van der Waals entre duas gotículas de óleo, além disso os cristais líquidos conferem poder hidratante às formulações, por mimetizarem as bicamadas lamelares das membranas celulares (DAHMAS, 1991). Tais cristais mistos lamelares podem intumescer em função do conteúdo total de água, isto é, parte da água é interlamelarmente ligada. Em geral pode ser estabelecido que, com o crescimento do comprimento da cadeia polioxietilênica, a capacidade de retenção de água interlamelar de uma emulsão O/A também aumenta. Esta água interlamelar está em equilíbrio dinâmico com a água do sistema (água não ligada), isto é, quando a água do sistema evapora, a água ligada interlamelarmente se transforma em água do sistema, prolongando a hidrofília destas formulações, o que é benéfico para o consumidor (SAMPAIO, 1998).

Apesar das ceras auto emulsionantes apresentarem em sua composição os agentes de consistência, muitas vezes há a necessidade de adição extra de agentes de consistência com a finalidade de melhorar a estabilidade e a aplicabilidade. Os agentes de consistência usualmente empregados são de natureza graxa ou polimérica (SANCTIS, 2000).

Deste modo em algumas formulações (Tabela 2) optou-se pela incorporação de um derivado de celulose grau farmacêutico, a hidroxietilcelulose, conhecida comercialmente como Natrosol[®] 250 (AQUALON). Optou-se por este polímero pelo seu caráter não iônico compatível com o caráter também não iônico das ceras auto-emulsionantes. Em outras formulações (Tabela 2) adicionou-se um agente de consistência graxa, especificamente a cutina DSP 6B[®] (ICPQ; 1999) que corresponde ao diestearato de polietilenoglicol 6000; suas principais características são o caráter não iônico, propriedades espessantes e emulsionantes, excelente compatibilidade com a epiderme e mucosas, bem como a capacidade de diminuir o potencial de irritação dos tensoativos aniônicos.

Como emoliente, fase oleosa, foi empregado em todas as formulações o Crodamol GTCC[®] (CRODA; 2001) que se constitui de uma mistura de triglicerídeos de cadeia média, principalmente dos ácidos cáprico e caprílico, derivados do óleo de coco, saturados, possuindo baixa viscosidade. Como resultado esses óleos fluídos adquirem importantes propriedades de espalhamento e emoliente proporcionando seu uso como alternativa aos óleos minerais e vegetais. Além disso, segundo

SANCTIS (2000), estes óleos fluidos apresentam composição lipídica semelhante à da pele humana, reforçando seu emprego nas formulações (Tabela 2).

Quando a experiência ou os outros estudos de armazenagem indicam que é necessário um conservante sua seleção baseia-se no cruzamento de muitas considerações, entre outras, as seguintes: o conservante deve ser efetivo para prevenir o crescimento de microorganismos considerados contaminantes mais prováveis da preparação; deve ser suficientemente solúvel em água para atingir as concentrações adequadas na fase aquosa em sistemas com duas ou mais fases, além de apresentar características de lipossolubilidade; a concentração necessária do conservante não deve afetar a segurança ou o conforto do paciente quando a preparação é administrada pela via determinada, isto é, não irritante, não sensibilizante e não tóxico; deve ter a estabilidade adequada para manter-se nas concentrações em que é eficaz; deve ser completamente compatível com todos os excipientes da formulação, sem que haja interferências mútuas. Os conservantes usualmente utilizados incluem dentre outros o metilparabeno, que apresenta atividade antifúngica (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000). Para as formulações em estudos foi utilizado o metilparabeno na concentração de 0,2 %.

Com a finalidade de evitar o ressecamento das formulações e evitar a perda de água da pele, adicionou-se como agente umectante o propilenoglicol, tradicionalmente empregado com esta finalidade (SANCTIS, 2000).

Os processos de oxidação foram prevenidos com a adição de antioxidantes tradicionais, empregando-se deste modo nas formulações o butilhidroxitolueno (BHT), e agentes sequestrantes também usuais, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na forma dissódica, sendo que o uso destes agentes potencializa a ação do conservante pela quelação de metais essenciais ao crescimento de microorganismos (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1991).

5.1.2 Avaliação das Características Organolépticas das Formulações Prévias

A avaliação das características organolépticas das emulsões, numeradas de F 1 a F 10 (Tabela 9), foram efetuadas 48 horas após o preparo.

Tabela 9. Características organolépticas das formulações prévias.

FORMULAÇÕES	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS*
F1	- branca, brilhante, inodora, homogênea, com baixa consistência e pH 4,56
F2	- branca, opaca , inodora, homogênea, com boa consistência e pH 4,69
F3	- branca, opaca , inodora, homogênea, com alta consistência e pH 4,71
F4	- branca, brilhante, inodora, homogênea, com boa consistência e pH 4,92
F5	- branca, brilhante, inodora, homogênea, com alta consistência e pH 4,89
F6	- branca, brilhante, inodora, homogênea, com baixa consistência e pH 5,23
F7	- branca, opaca , inodora, homogênea, com boa consistência e pH 5,47
F8	- branca, opaca , inodora, homogênea, com alta consistência e pH 5,38
F9	- branca, brilhante, inodora, homogênea, com boa consistência e pH 5,17
F10	- branca, brilhante, inodora, homogênea, com alta consistência e pH 5,11

FONTE: O AUTOR

NOTA: ENCONTRAM-SE EM NEGRITO AS CARACTERÍSTICAS NÃO DESEJADAS NA FORMULAÇÃO.

Para a escolha da formulação mais adequada avaliaram-se as características organolépticas das formulações da tabela 2, conforme item 4.2.2 da metodologia. As formulações F 1 e F 6, que não receberam agentes espessantes, apresentaram baixa consistência (loção); as formulações F 2, F 3, F 8 e F 9, que receberam agente espessante graxo, apresentam-se opacas; as formulações F 5 e F 10, que receberam 0,5 % de agente espessante polimérico, apresentaram alta consistência e as formulações F 4 e F 9, que receberam 0,2 % de agente espessante polimérico, apresentaram-se adequadas para o uso; conforme mostra a Tabela 9. A formulação escolhida para a incorporação do ácido kójico foi a formulação F 4 (Tabela 10) tendo em vista a disponibilidade da base auto emulsionante Emulgade Wax[®] para a realização do trabalho.

Tabela 10. Formulação escolhida para a incorporação do ácido kójico.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
FASE 1 (OLEOSA)		
Álcool cetoestearílico e álcool cetoestearílico etoxilado, estearato de sorbitano e monooleato de sorbitano etoxilado (20OE) – Emulgade Wax ®	15,0	Emulsionante
Triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico – Crodamol GTCC ®	10,0	Emoliente
Butilhidroxitolueno	0,20	Antioxidante
FASE 2 (AQUOSA)		
Hidroxietilcelulose – Natrosol 250 HHR ®	0,20	Espessante
EDTA dissódico	0,20	Ag. sequestrante
p-hidroxibenzoato de metila – Nipagin ®	0,20	Conservante
Propilenoglicol	8,00	Umectante
Ácido kójico	2,00	Princípio ativo
Água deionizada	q.s.p. 100g	Veículo

FONTE: O AUTOR

5.1.3 Avaliação Preliminar da Estabilidade da Formulação F 4

Para avaliação preliminar da estabilidade da formulação F 4, escolhida para incorporação do ácido kójico, estabeleceu-se como parâmetro as análises efetuadas 48 horas após o preparo da formulação, denominado tempo zero. Conforme se observa na Tabela 11, a formulação F 4 não apresentou nenhum ponto de instabilidade, no tempo zero e após submetida às condições aceleradas descritas em 4.2.3.

Tabela 11. Avaliação preliminar da estabilidade da formulação F 4 sob diversas condições aceleradas.

CARACTERÍSTICA	ESTABILIDADE			
	Tempo zero	A/R	Estufa 40°C	Centrifugação
Cor	branca, brilhante	branca, brilhante	branca, brilhante	branca, brilhante
Odor	inodoro	inodoro	inodoro	inodoro
Homogeneidade	presente	presente	presente	presente
pH	entre 4,5 e 5,5	entre 4,5 e 5,5	entre 4,5 e 5,5	entre 4,5 e 5,5

FONTE: O AUTOR

NOTA: A/R = AQUECIMENTO/RESFRIAMENTO (40°C / 2°C)

Cabe ressaltar que esses ensaios prévios de estabilidade foram realizados apenas com a finalidade de selecionar a formulação e não visando a determinação do prazo de validade da mesma, porque para este haveria a necessidade de

submetê-la a outras condições, conforme citações de LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG (2001).

Para o desenvolvimento dos ensaios de permeação cutânea do ácido kójico é imprescindível que haja um método de quantificação para esta substância. Pelo fato de não ter sido encontrada na literatura uma metodologia analítica validada para este fim, uma das etapas do trabalho foi desenvolver e validar um método analítico que permitisse quantificar o ácido kójico na matéria-prima e na formulação.

5.2 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

Pela observação das características da estrutura química do ácido kójico (Figura 4) nota-se a presença de insaturações alternadas e pares de elétrons não ligantes, arranjo eletrônico este que caracteriza um cromóforo que, possivelmente, absorve na região ultravioleta do espectro eletromagnético. Portanto, foi verificado se estas características possibilitavam o desenvolvimento de um método analítico de quantificação por espectrofotometria no ultravioleta.

Para a confirmação da presença de um cromóforo que absorva no ultravioleta foi realizado um espectro de varredura de solução aquosa de ácido kójico na região de 200 a 400 nm. A Figura 8 evidencia a existência de uma banda de absorção na faixa de 260 a 305 nm, com absorção máxima em 269 nm, o que possibilita o uso da espectrofotometria no ultravioleta para a quantificação do ácido kójico.

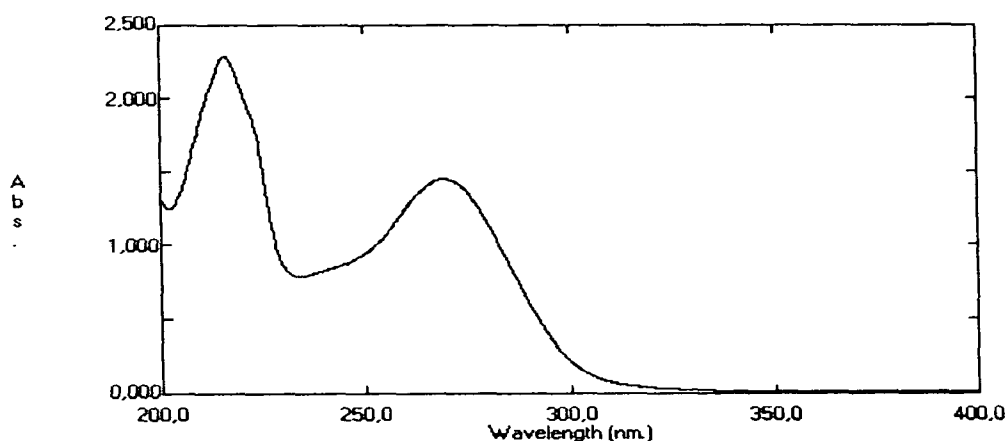


Figura 8: Espectro de absorção no ultravioleta da solução aquosa de ácido kójico padrão 25 µg/ml.

O desenvolvimento e validação do método consistiram na definição e avaliação de parâmetros como: faixa de linearidade, sensibilidade, robustez, exatidão e precisão.

5.2.1 Curva Padrão do Ácido Kójico por Espectrofotometria no Ultravioleta

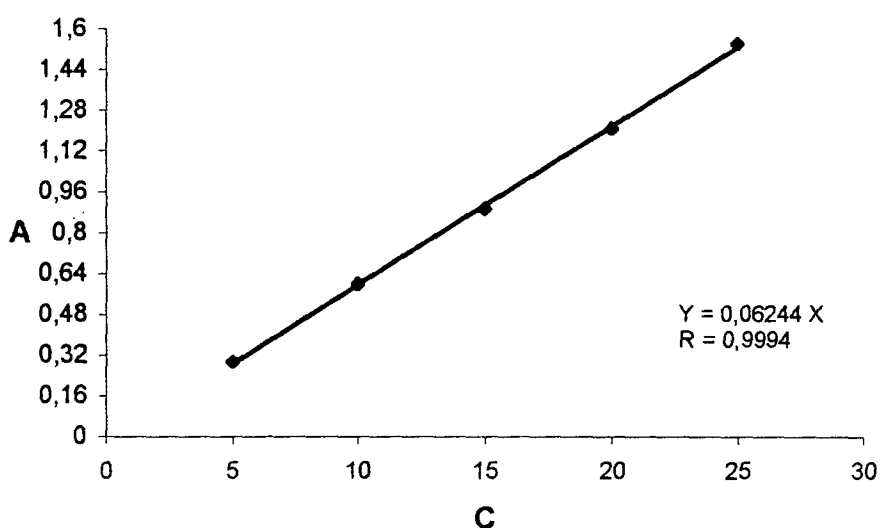
A faixa de linearidade e a sensibilidade do método foram verificadas através da construção de uma curva padrão do ácido kójico, em solução aquosa, em diferentes concentrações.

Os valores de absorvâncias destas soluções, obtidas em 269 nm, estão demonstrados na Tabela 12 e a representação gráfica desta curva pode ser visualizada na Figura 9.

Tabela 12. Valores de absorvância obtidos por espectrofotometria de absorção no ultravioleta para construção da curva padrão de ácido kójico.

CONCENTRAÇÃO (µg/ml)		5	10	15	20	25
Pesagem 1	A 1	0,296	0,559	0,894	1,201	1,543
	A 2	0,294	0,600	0,893	1,202	1,543
	A 3	0,296	0,600	0,893	1,203	1,543
Pesagem 2	A 1	0,297	0,597	0,895	1,218	1,544
	A 2	0,299	0,599	0,897	1,221	1,547
	A 3	0,299	0,599	0,894	1,206	1,549
Pesagem3	A 1	0,293	0,601	0,893	1,212	1,547
	A 2	0,293	0,602	0,892	1,220	1,542
	A 3	0,292	0,603	0,893	1,215	1,543
ABS Média		0,2947	0,6000	0,8938	1,2109	1,5446
DPR%		0,88	0,30	0,17	0,66	0,16

FONTE: O AUTOR



FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; C = Concentração de ácido kójico ($\mu\text{g/ml}$); $n = 9$; $\lambda = 269 \text{ nm}$; Branco = água deionizada.

Figura 9: Representação gráfica da curva padrão de ácido kójico obtida por espectrometria de absorção no ultravioleta (269 nm).

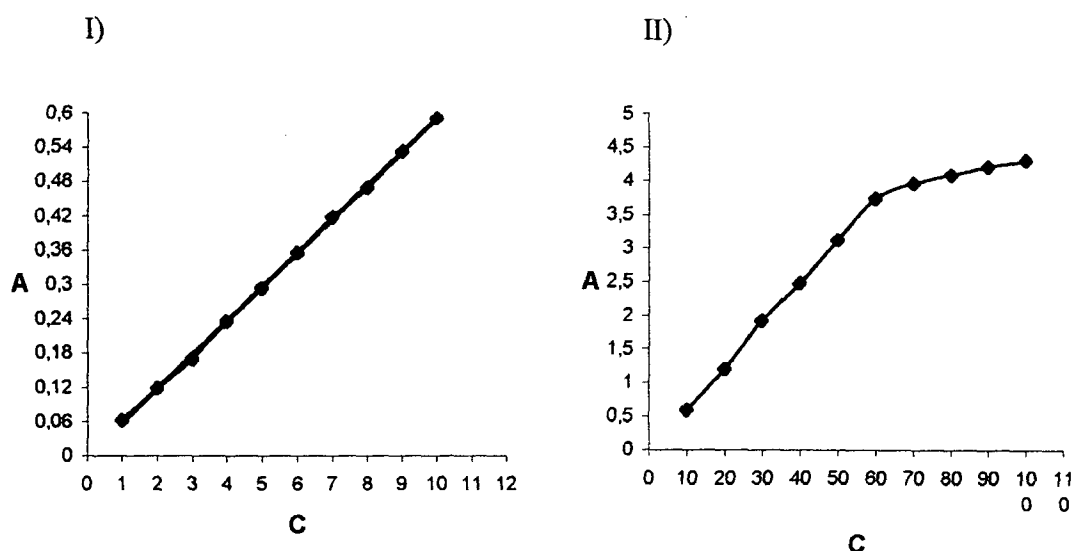
A curva padrão do ácido kójico apresentou um coeficiente de correlação ($r=0,9994$), próximo de 1, demonstrando que há correlação linear entre as concentrações e os valores de absorvância, na faixa de 5 a 25 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2 Sensibilidade

A sensibilidade do método é obtida pela inclinação da curva padrão e sua análise deve sempre ser feita comparativamente com outro método. A inclinação obtida neste método foi de 0,06244.

5.2.3 Linearidade

A linearidade do método foi também avaliada em concentrações abaixo de 5 $\mu\text{g/ml}$ e acima de 25 $\mu\text{g/ml}$, como pode ser observado na Figura 10.



FONTE: O AUTOR

NOTA: I) LIMITE INFERIOR DA LINEARIDADE; II) LIMITE SUPERIOR DA LINEARIDADE

Legenda: A = Absorvância; C = Concentração de ácido kójico ($\mu\text{g/ml}$); $n = 6$; $\lambda = 269 \text{ nm}$; Branco = água deionizada

Figura 10: Representação gráfica para determinação da linearidade do método de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

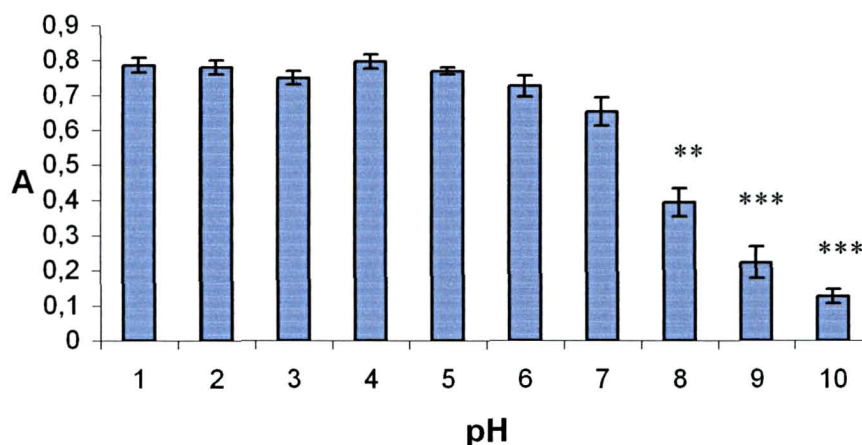
A curva padrão do ácido kójico obtida por espectrofotometria no ultravioleta apresenta linearidade entre os valores de 1 e 60 $\mu\text{g/ml}$ de ácido kójico, sendo esta a faixa onde os resultados gerados são proporcionais à concentração do fármaco em análise. São considerados satisfatórios resultados com um coeficiente de determinação de cerca de 0,98 (CHASIN et al., 1998).

5.2.4 Robustez

É a habilidade do resultado de um método permanecer inalterado por pequenas mudanças de parâmetros operacionais e ambientais. A robustez de um método pode ser determinada através da análise individual ou simultânea dos parâmetros mais sujeitos à variação.

5.2.4.1 Influência do pH

Em pH alcalino, à medida que aumenta o valor do pH há uma diminuição nos valores de absorvâncias (figura 11). Esta diminuição está de acordo com o que se observa no espectro do ultravioleta em pH alcalino (9,0), onde pode se observar um deslocamento batocrômico com máximo de absorção em 312 nm, conforme mostra a Figura 12.



FONTE: O AUTOR

NOTA: ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

Legenda: A = Absorvância; pH = pH da solução 20 $\mu\text{g/ml}$ de ácido kójico; $n = 9$ (Média \pm SD); $\lambda = 269 \text{ nm}$; Brancos = soluções tampão isentas de ácido kójico.

Figura 11: Representação gráfica da influência do pH na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

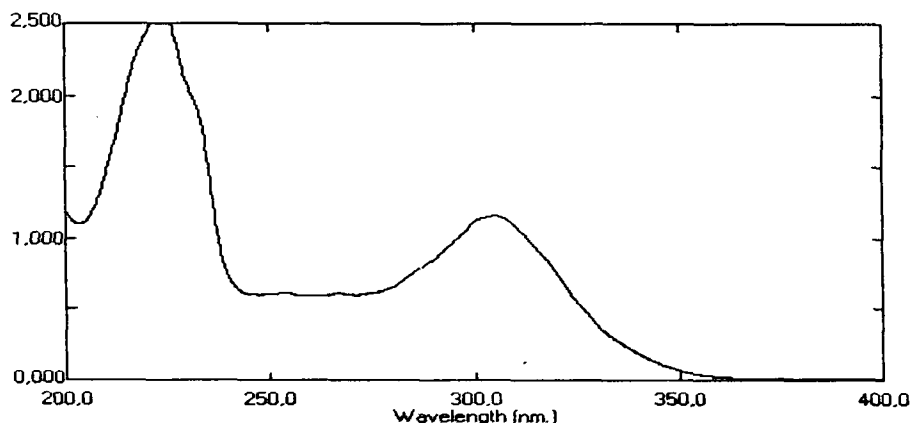


Figura 12: Espectro de absorção no ultravioleta da solução padrão de ácido kójico 25 $\mu\text{g/ml}$ em tampão $\text{H}_3\text{BO}_3\text{KCl} - \text{NaOH}$ (pH 9,0).

Como o ácido kójico apresenta $\text{pK}_a = 7,9$; próximo ao pK_a do fenol que é 8,2 (THE MERCK INDEX, 1983), uma possível explicação para o deslocamento observado em pH básico seria a ionização da hidroxila enólica do ácido kójico, onde a forma ionizada apresenta estrutura eletrônica distinta da forma não ionizada e portanto os espectros de absorção no ultravioleta resultantes são diferentes.

Outra possível explicação para este deslocamento pode ser devido a uma reação de adição nucleofílica a dupla ligação do carbono carbonílico que é característico de aldeídos e cetonas. A disposição plana triangular dos grupos em torno do átomo de carbono da carbonila significa que este está relativamente aberto aos ataques por cima ou por baixo. A carga positiva no átomo de carbono carbonílico significa que ele é especialmente susceptível ao ataque por um nucleófilo. A adição nucleofílica de um reagente nucleófilo forte converte o aldeído ou a cetona, planos triangulares em um produto tetraédrico. O aspecto importante desta etapa é a capacidade de o átomo de oxigênio carbonílico acomodar o par de elétrons da dupla ligação carbono-oxigênio (SOLOMONS, 1994).

Os espectros do ácido kójico em pH 3,0 e pH 6,0 (Figuras 13 e 14, respectivamente) são semelhantes, apresentando máximo de absorção em 269 nm.

O método sofre influência dos valores de pH do meio, sendo por tanto mais estável em valores de pH menores que 7,0. Em todos os experimentos de validação desta metodologia trabalhou-se em uma faixa de pH entre 5,0 e 6,0, resultante da solução aquosa de ácido kójico.

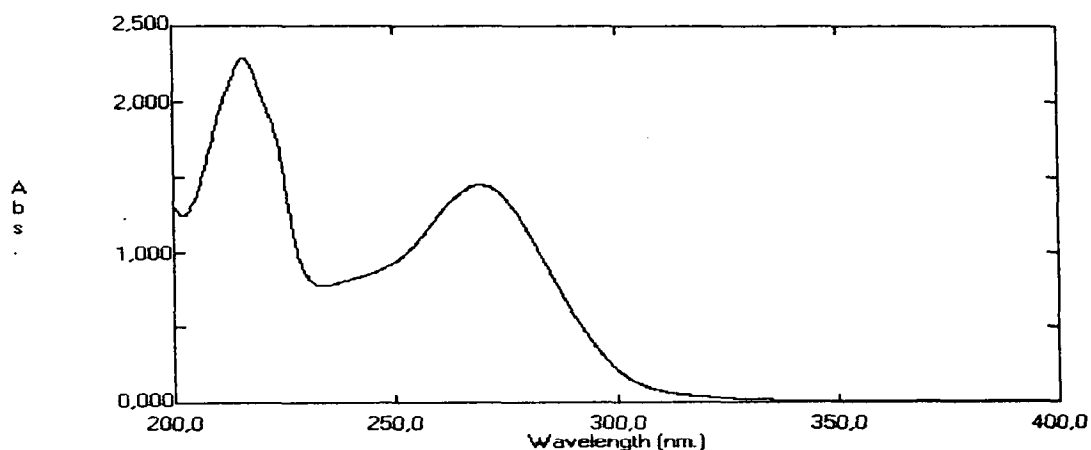


Figura 13: Espectro de absorção no ultravioleta da solução padrão de ácido kójico 25 µg/ml em tampão acetato (pH 3,0).

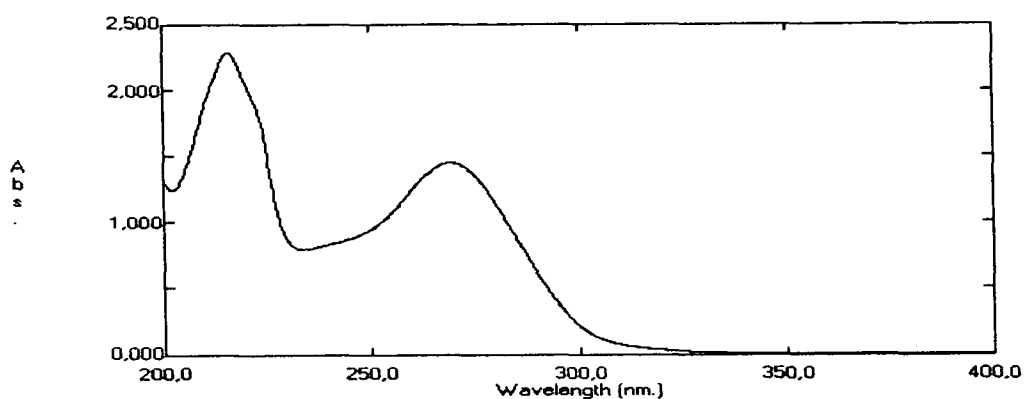
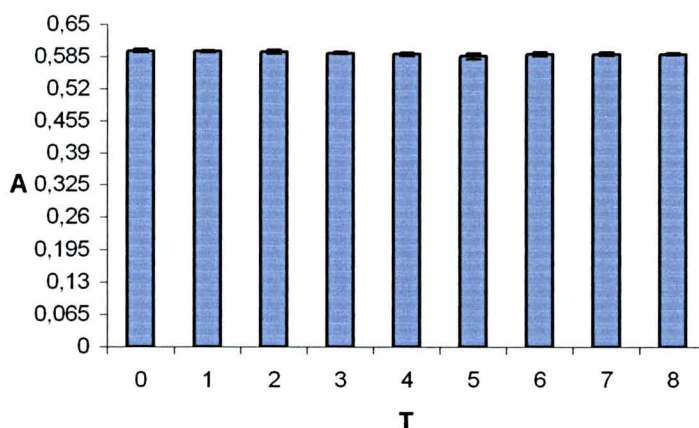


Figura 14: Espectro de absorção no ultravioleta da solução padrão de ácido kójico 25 µg/ml em água (pH 6,0).

5.2.4.2 Influência do tempo de leitura

A estabilidade da leitura foi também avaliada em função do tempo após o preparo da solução. Como pode ser observado na Figura 15, não houve alteração nos valores de absorvâncias lidos no período de até oito horas, evidenciando que o ácido kójico é uma substância estável (MAEDA, 1996).



FONTE: O AUTOR

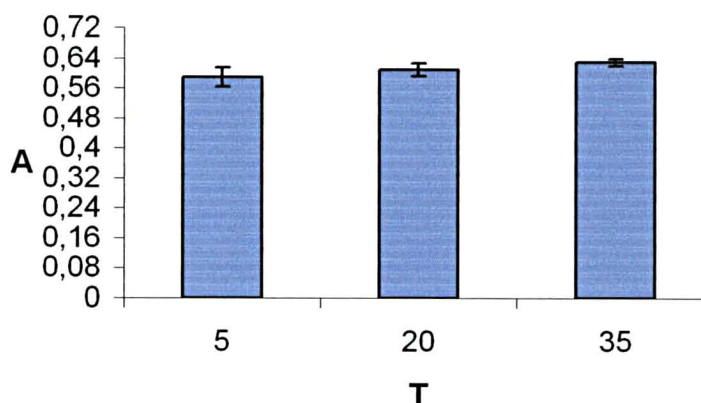
Legenda: A = Absorvância; T = tempo de leitura da solução de ácido kójico 20 µg/ml (horas); n = 9 (Média ± SD); λ =269 nm; Branco = água deionizada.

Figura 15: Representação gráfica da influência do tempo de leitura na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

5.1.4.3 Influência da temperatura

Foi avaliada a estabilidade das leituras de absorvância nas temperaturas de 5, 20 e 35°C.

Os valores de absorvância mostraram-se estáveis frente a estas diferentes temperaturas (Figura 16).



FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; T = temperatura da solução de ácido kójico 20 µg/ml (°C); n = 9 (Média ± SD); λ = 269 nm; Branco = água deionizada.

Figura 16: Representação gráfica da influência da temperatura na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Através da análise destes três parâmetros (pH, tempo de leitura e temperatura) pode-se dizer que o método de doseamento do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta é robusto desde que se tenha controle sobre os valores de pH e que este esteja preferencialmente abaixo de 7,0.

5.2.5 Exatidão

A exatidão do método para quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta foi verificada através do ensaio de recuperação.

Em um primeiro momento os resultados obtidos não se apresentaram de acordo com o esperado, pois a porcentagem de recuperação era maior do que a adicionada a formulação. Devido a este fato, foi necessário pesquisar se havia interferência de algum componente do veículo na leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 269 nm.

O constituinte, metilparabeno (Figura 17) é o que apresenta maior semelhança eletrônica com o ácido kójico por possuir insaturações e pares de elétrons não ligantes, sendo o provável interferente no ensaio de recuperação. O espectro de varredura desta substância (Figura 18) mostra uma banda de absorção na mesma faixa espectral (250 a 300 nm) que o ácido kójico, mostrando que o

mesmo interfere nos valores de absorvâncias, não sendo possível a quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta quando estas duas substâncias estão presentes no mesmo sistema.

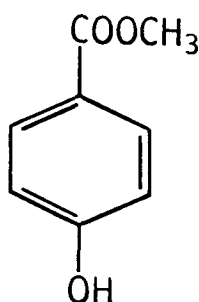


Figura 17: Estrutura do metilparabeno (THE MERCK INDEX, 1983)

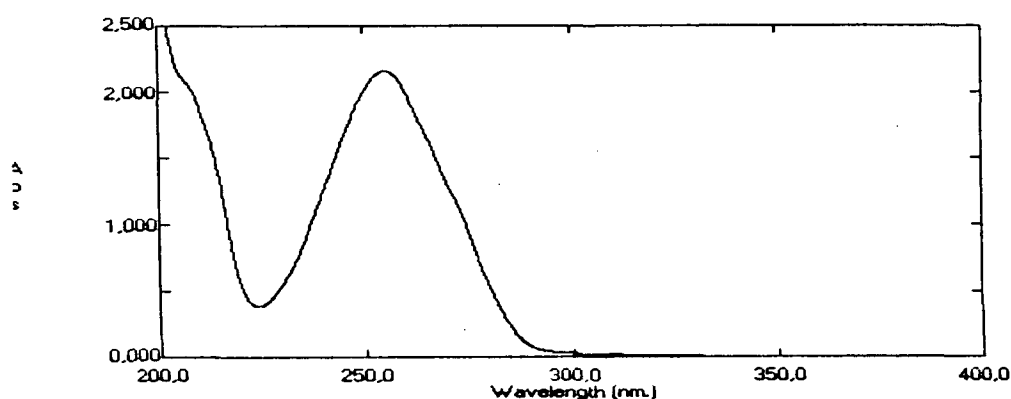


Figura 18: Espectro de absorção no ultravioleta da solução aquosa do conservante metilparabeno (Nipagin®) 25 µg/ml.

Para a realização do ensaio de exatidão por recuperação do ativo foi utilizado o veículo sem o conservante, tendo em vista que os demais componentes não mostraram absorção na região do espectro utilizada para a quantificação do ácido kójico e por tanto não interferem neste ensaio.

O método de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta mostrou-se exato, tendo em vista que as porcentagens de recuperação obtidas neste ensaio estão próximas de 100 % (98,33 %, 98,75 % e 99,04%) e situa-se dentro do limite, que é considerado aceitável, de 98 % a 102 % (Tabela 13) (Leite, 2002).

Tabela 13. Valores de absorvância e porcentagem de recuperação obtidos no teste de exatidão

AMOSTRAS	AMOSTRA INCORPORADA 0,5% DE PADRÃO	AMOSTRA INCORPORADA 1% DE PADRÃO	AMOSTRA INCORPORADA 2% DE PADRÃO
Absorvâncias	1,193 1,190 1,189	1,197 1,193 1,197	1,199 1,203 1,196
A Média	1,1907	1,1957	1,1993
DPR	0,17	0,19	0,29
Porcentagem de recuperação	98,33	98,75	99,04

FONTE: O AUTOR

5.2.6 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária, não sendo analisada a reprodutibilidade do método, tendo em vista que não foi realizada uma triagem de medidas interlaboratoriais.

Os resultados do ensaio de repetibilidade apresentou valores de desvios padrão relativo inferiores a 1 %, valor normalmente aceito, indicando que o método apresenta boa precisão intra-dia (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de absorvâncias obtidos na avaliação da variação intra-dia.

CONCENTRAÇÃO (µg/ml)	5	10	15	20	25
A 1	0,302	0,600	0,893	1,202	1,543
A 2	0,301	0,603	0,895	1,200	1,542
A 3	0,305	0,598	0,892	1,197	1,546
A Média	0,3027	0,6003	0,8933	1,1997	1,5437
DPR	0,69	0,43	0,17	0,21	0,13

FONTE: O AUTOR

Os valores de DPR encontrados para avaliação da variação inter-dias (Tabela 15) demonstram que o método apresenta boa precisão quando realizado em dias diferentes, por diferentes analistas e em diferentes equipamentos, tendo em vista que os valores de DPR abaixo de 2,0% são aceitáveis (CHASIN et al., 1998).

Tabela 15. Valores de absorvância obtidos na avaliação da variação inter-dias.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)		5	10	15	20	25
Dia 1	A 1	0,302	0,600	0,893	1,202	1,543
	A 2	0,301	0,603	0,895	1,200	1,542
	A 3	0,305	0,598	0,892	1,197	1,546
Dia 2	A 1	0,307	0,602	0,899	1,207	1,551
	A 2	0,305	0,604	0,897	1,206	1,549
	A 3	0,307	0,604	0,897	1,206	1,548
A Média		0,3045	0,6018	0,8955	1,2030	1,5465
DPR		0,82	0,40	0,30	0,33	0,23

FONTE: O AUTOR

Embora tenha sido demonstrado que o procedimento é estável para a quantificação do ácido fólico (doseamento) na matéria-prima, há limitações para a aplicação do mesmo quando se trata de formulações contendo metilparabeno como conservante ou outro composto que tenha um cromóforo que absorva na faixa de 200 a 300 nm.

Uma vez que um dos objetivos do trabalho era determinar o teor de ácido fólico na forma farmacêutica, buscou-se um outro método que apresentasse maior especificidade em relação aos componentes da formulação. Não é sempre possível demonstrar que um procedimento analítico é específico para um analito particular. Neste caso a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos é recomendada para alcançar o nível necessário de discriminação (ICH, 1995).

5.3 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO

Analisando a estrutura do ácido fólico observa-se a presença de grupos com pares de elétrons não ligantes e características estereoquímicas que guardam algumas semelhanças com outros compostos que se têm conhecimento de que formam compostos de coordenação com o íon férrico. Devido a isto, investigou-se a

possibilidade de uma metodologia de quantificação do ácido kójico pela reação com o cloreto férrico.

O sistema reagente contendo cloreto férrico e ácido kójico apresenta uma banda de absorção na faixa de 400 a 600 nm, com pico máximo em 503 nm (Figura 19). Como nem a solução aquosa de cloreto férrico nem a solução aquosa de ácido kójico absorvem nesta faixa do espectro, a banda de absorção resultante provavelmente depende da interação destas duas substâncias.

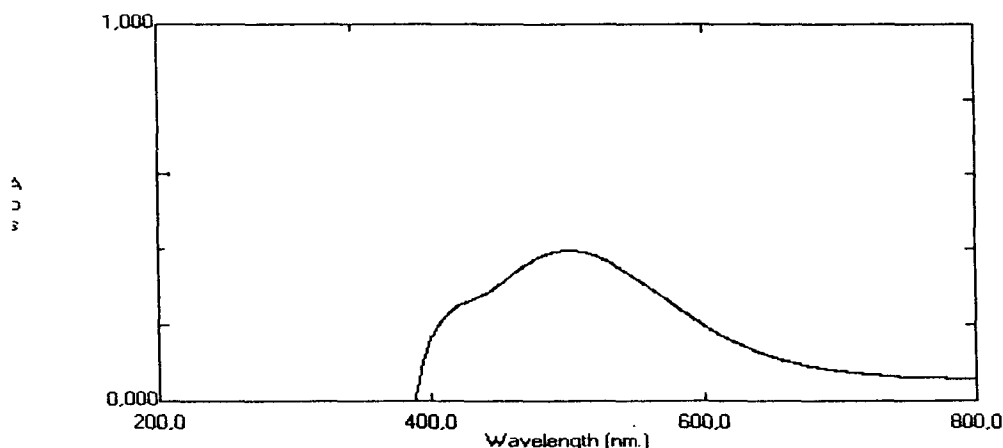


Figura 19: Espectro de absorção do ácido kójico padrão (25 µg/ml) pelo método do cloreto férrico.

Quando o sistema reagente contendo cloreto férrico e metilparabeno é submetido ao espectro de varredura, observa-se que não há nenhuma absorção na mesma faixa do que o sistema contendo ácido kójico (400 a 600 nm), o que indica que a presença deste conservante não interfere na medida da absorção produzida pelo sistema contendo ácido kójico e cloreto férrico (Figura 20). Devido a isto, a quantificação do ácido kójico utilizando esta metodologia pode ser feita tanto nas matérias-primas quanto nas formulações farmacêuticas em que o metilparabeno esteja presente como conservante.

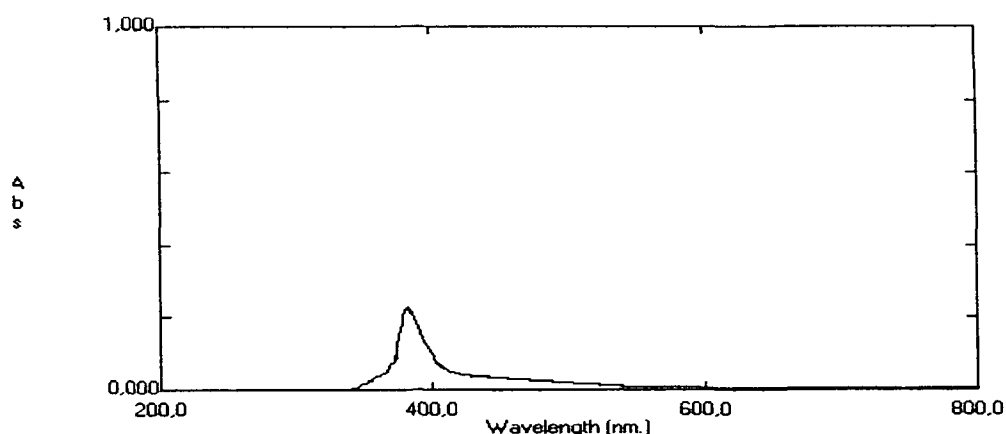


Figura 20: Espectro de absorção do metilparabeno (25 µg/ml) pelo método do cloreto férrico.

Para que o método proposto fosse desenvolvido e validado foi realizada a definição e a avaliação de parâmetros como: determinação da concentração de cloreto férrico a ser utilizado, faixa de linearidade, sensibilidade, robustez, exatidão e precisão.

5.3.1 Determinação da Influência da Concentração de Cloreto Férrico na Intensidade de Cor na Solução com o Ácido Kójico

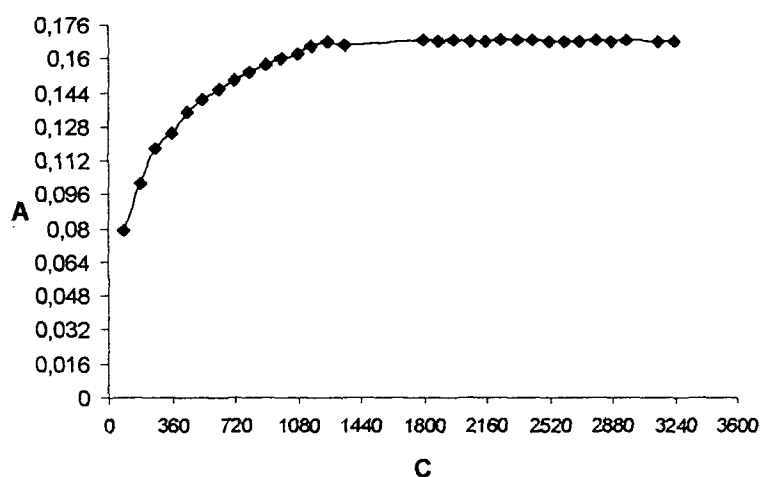
Com o objetivo de definir a concentração da solução de cloreto férrico mais adequada para a obtenção de uma coloração estável com 100 µg de ácido kójico, foi efetuada a leitura das absorvâncias de diversos sistemas contendo concentrações distintas de cloreto férrico (Tabela 16).

Tabela 16. Valores de absorvância de sistemas contendo 100 µg de ácido kójico padrão e diferentes concentrações de cloreto férrico.

cloreto férrico (µg/ml)	90	180	270	360	450	540	630	720	810	900	990	1080	1160	1260	1350	1800
ABS 1	0,077	0,100	0,119	0,125	0,133	0,141	0,144	0,151	0,153	0,156	0,161	0,161	0,166	0,168	0,167	0,169
ABS 2	0,081	0,101	0,119	0,126	0,135	0,142	0,146	0,151	0,153	0,157	0,161	0,163	0,167	0,167	0,167	0,168
ABS 3	0,079	0,102	0,116	0,124	0,137	0,140	0,148	0,148	0,156	0,158	0,159	0,162	0,165	0,169	0,166	0,169
Média	0,079	0,101	0,118	0,125	0,135	0,141	0,146	0,15	0,154	0,157	0,160	0,162	0,166	0,168	0,167	0,169
DPR	2,53	1,00	1,47	0,46	1,48	0,71	1,37	1,15	1,12	0,64	0,72	0,62	0,60	0,60	0,35	0,34
cloreto férrico (µg/ml)	1890	1980	2070	2160	2250	2340	2430	2520	2610	2700	2790	2880	2970	3060	3150	3240
ABS 1	0,168	0,169	0,167	0,168	0,169	0,170	0,168	0,169	0,167	0,169	0,169	0,167	0,169	0,168	0,168	0,169
ABS 2	0,169	0,169	0,168	0,168	0,168	0,168	0,169	0,167	0,168	0,167	0,169	0,168	0,170	0,168	0,167	0,169
ABS 3	0,168	0,168	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,168	0,168	0,168	0,169	0,167	0,168	0,168
Média	0,168	0,168	0,168	0,168	0,168	0,169	0,169	0,168	0,168	0,168	0,169	0,168	0,169	0,168	0,168	0,169
DPR	0,34	0,34	0,6	0,34	0,34	0,6	0,34	0,68	0,6	0,6	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34

FONTE: O AUTOR

A curva obtida (Figura 21) demonstra que a concentração mínima de cloreto férrico que produz uma cor estável com 100 µg de ácido kójico é de 1160 µg/ml e que um excesso de cloreto férrico não interfere na medida das absorvâncias geradas pelos sistemas. Com base nesta evidência, utilizou-se em todos os sistemas avaliados concentração de cloreto férrico de 2700 µg/ml, garantindo desta maneira que os sistemas apresentassem a coloração máxima que são capazes de adquirir.



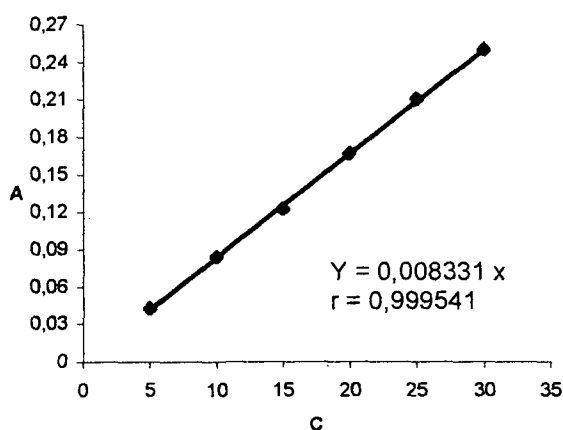
FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; C = concentração de cloreto férrico ($\mu\text{g/ml}$); $n = 9$; $\lambda = 503 \text{ nm}$; Branco = Sistemas isentos de ácido kójico.

Figura 21: Representação gráfica da curva obtida para determinação da concentração mais adequada de cloreto férrico para reagir com $100 \mu\text{g}$ de ácido kójico padrão.

5.3.2 Curva Padrão do Ácido Kójico por Espectrofotometria no visível pelo Cloreto Férrico

A construção de uma curva padrão, por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico, com sistemas contendo concentrações de ácido kójico na faixa de 5 a $30 \mu\text{g/ml}$ permitiu verificar que este método analítico apresentou linearidade neste intervalo, com coeficiente de correlação de 0,999541 (Figura 22)



FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; C = concentração de ácido kójico (µg/ml); n = 9; λ = 503 nm; Branco = Sistema isento de ácido kójico.

Figura 22: Representação gráfica da curva padrão do ácido kójico obtida por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

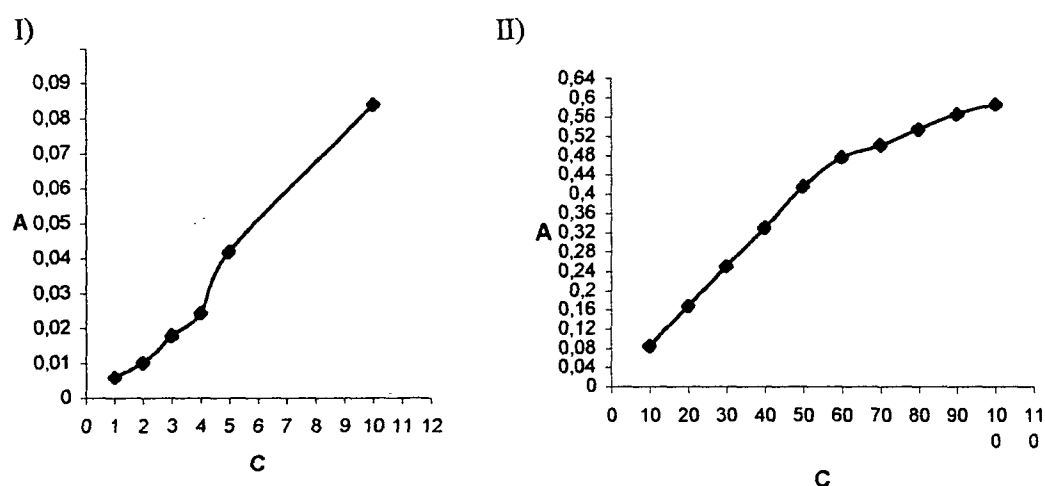
5.3.3 Sensibilidade

O valor da inclinação da curva padrão do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico é de 0,008331. Como este valor é menor que o encontrado na curva padrão do ácido kójico no ultravioleta, para as mesmas concentrações, pode-se afirmar que a metodologia de quantificação por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico é menos sensível, e por isso não é tão capaz de diferenciar pequenas concentrações do ativo (CHASIN et al., 1998).

5.3.4 Linearidade

A linearidade foi também avaliada em concentrações abaixo de 5 µg/ml e acima de 30 µg/ml (Figura 23).

Verifica-se que o método apresenta linearidade no intervalo de concentração de 5 a 60 µg/ml. Quando as absorvâncias dos valores extremos (maior que 60 µg/ml e menor que 5 µg/ml) são considerados, o coeficiente de correlação linear encontra-se abaixo do valor de referência aceito que é de 0,98 (LEITE, 2002).



FONTE: O AUTOR

NOTA: I) LIMITE INFERIOR DA LINEARIDADE; II) LIMITE SUPERIOR DA LINEARIDADE

Legenda: A = Absorvância; C = Concentração de ácido kójico (µg/ml); n = 6; λ = 269 nm; Branco = água deionizada.

Figura 23: Representação gráfica para determinação da linearidade do método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico.

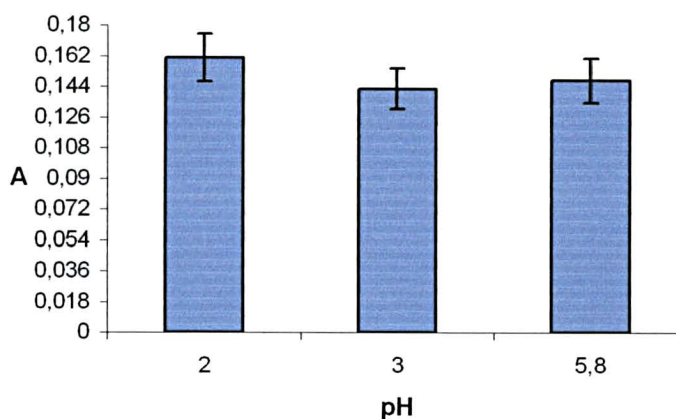
5.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da verificação da influência do pH, do tempo de leitura e da temperatura nos valores de absorvâncias.

5.3.5.1 Influência do pH

A influência do pH foi verificada apenas em pH ácido, pois o cloreto férrico em meio alcalino, forma precipitado, o que inviabiliza a utilização do cloreto férrico para esta aplicação.

Através da Figura 24 pode-se observar que não há diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de absorvância nos diferentes valores de pH. O pH de escolha é o do sistema contendo a mistura reacional de cloreto férrico e ácido kójico em água (pH 5,8), dispensando desta forma a utilização de um sistema tamponante.



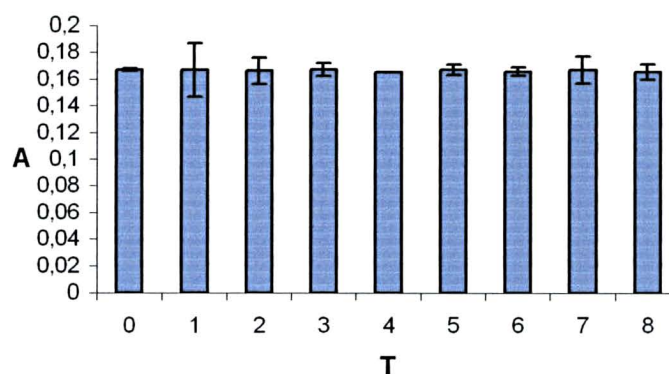
FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; pH = pH do sistema; n = 9 (Média \pm SD); λ = 503 nm; Branco = Sistemas tamponados isentos de ácido kójico.

Figura 24: Representação gráfica da influência do pH na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

5.3.5.2 Influência do tempo de leitura

A estabilidade da leitura foi também avaliada em função do tempo após o preparo dos sistemas. Como pode ser observado na Figura 25, não houve alteração significativa nos valores de absorvância lidos no período de até oito horas.



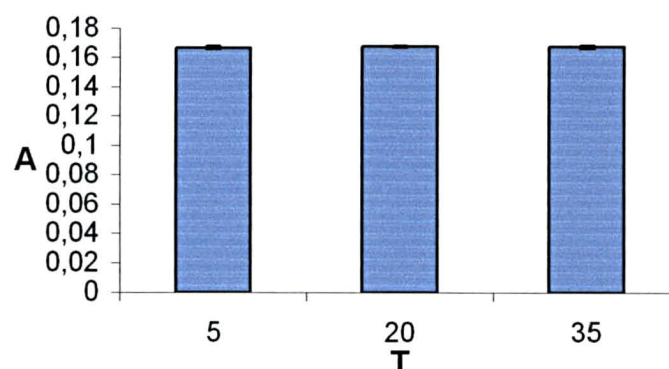
FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; T = tempo de leitura do sistema com 20 µg/ml de ácido kójico (horas); n = 9 (Média ± SD); λ = 503 nm; Branco = Sistema isento de ácido kójico.

Figura 25: Representação gráfica da influência do tempo de leitura na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

5.3.5.3 Influência da temperatura

Nos valores de temperaturas testadas (5°C, 20°C e 35°C) não foi observada diferença significativa nos valores de absorvâncias, o que sugere que este parâmetro, no intervalo de temperatura analisado, não influencia nesse ensaio (Figura 26).



FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; T = temperatura do sistema com 20 µg/ml de ácido kójico (°C); n = 9 (Média ± SD); λ = 503 nm; Branco= Sistema isento de ácido kójico.

Figura 26: Representação gráfica da influência da temperatura na determinação do teor de ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico.

5.3.6 Exatidão

A exatidão do método para quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico foi verificada através do ensaio de recuperação.

Este método mostrou-se exato tendo em vista que as porcentagens de recuperação de ácido kójico incorporada na formulação F 4 estão próximas de 100 % (99,1 %, 99,7 % e 99,7 %) e encontram-se situados dentro do limite aceito, que é de 98 % a 102 %, conforme mostra a Tabela 17 (LEITE, 2002).

Tabela 17. Valores de absorvância e porcentagem de recuperação do ácido kójico obtidos no teste de exatidão.

AMOSTRAS	AMOSTRA INCORPORADA 0,5% DE PADRÃO	AMOSTRA INCORPORADA 1% DE PADRÃO	AMOSTRA INCORPORADA 2% DE PADRÃO
Absorvâncias	0,334	0,334	0,335
	0,332	0,335	0,335
	0,332	0,334	0,334
A Média	0,3326	0,3346	0,3346
DPR	0,34	0,17	0,17
Porcentagem de recuperação	99,1%	99,7%	99,7%

FONTE: O AUTOR

5.3.7 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária, não sendo analisada a reprodutibilidade do método, tendo em vista que não foi realizada uma triagem de medidas interlaboratoriais.

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram desvios padrão relativos (máximo de 0,68 para a repetibilidade e menores que 0,91 para a precisão intermediária) dentro dos limites de valores aceitáveis, ou seja, inferior a 1 % em análises realizadas no mesmo dia e inferiores a 2 % em análises realizadas em dias diferentes, por analistas diferentes e em aparelhos distintos (CHASIN, 1998). Estes resultados mostram que o método apresenta boa precisão intra-dia e inter-dias (Tabela 18 e 19).

Tabela 18. Valores de absorvância obtidos na avaliação da variação intra-dia

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)	5	10	15	20	25
A 1	0,041	0,085	0,124	0,168	0,208
A 2	0,041	0,084	0,125	0,168	0,209
A 3	0,042	0,085	0,125	0,167	0,209
A Média	0,0413	0,0846	0,1246	0,1676	0,2086
DPR	0,4	0,68	0,46	0,34	0,28

FONTE: O AUTOR

Tabela 19. Valores de absorvância obtidos na avaliação da variação inter-dias.

CONCENTRAÇÃO (µg/ml)		5	10	15	20	25
Dia 1	A 1	0,041	0,085	0,124	0,168	0,208
	A 2	0,041	0,084	0,125	0,168	0,209
	A 3	0,042	0,085	0,125	0,167	0,209
Dia 2	A 1	0,041	0,084	0,125	0,167	0,210
	A 2	0,040	0,083	0,126	0,168	0,209
	A 3	0,041	0,083	0,125	0,167	0,209
A Média		0,041	0,084	0,125	0,1676	0,209
DPR		0,91	0,74	0,69	0,61	0,56

FONTE: O AUTOR

Este método de quantificação mostrou-se satisfatório ao objetivo inicial de permitir a quantificação do ácido kójico matéria-prima e na formulação, mesmo na presença do conservante metilparabeno. Porém, cabe salientar que outras formulações, diferentes da estudada, podem apresentar outros componentes que venham interferir no método. Por tanto, é aconselhável que um método analítico seja testado e, se necessário, adaptado para cada situação diferente daquela para qual o método foi validado.

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Comparando as duas metodologias de quantificação do ácido kójico desenvolvidas e validadas (Tabela 20) os valores de inclinação da reta (0,06244 na espectrofotometria no ultravioleta e 0,008331 no método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico) sugerem que o método espectrofotométrico no ultravioleta é o mais sensível. No entanto, este apresenta a limitação de não poder ser utilizado quando a formulação apresenta metilparabeno ou outro composto que absorva no mesmo comprimento de onda que o ácido kójico.

Tabela 20. Comparação entre os métodos de quantificação do ácido kójico.

MÉTODO	ULTRAVIOLETA	CLORETO FÉRRICO
PARÂMETROS		
Interferência do metilparabeno	Sim	Não
Linearidade (µg/ml)	1 - 60	5 - 60
Sensibilidade*	0,06244	0,008331
Influência do pH	Sim	Sim
Influência do tempo de leitura	Não	Não
Influência da temperatura	Não	Não
Exatidão	Sim	Sim
Precisão intra-dia	Sim	Sim
Precisão inter-dias	Sim	Sim

FONTE: O AUTOR

NOTA: * SENSIBILIDADE OBTIDA PELA INCLINAÇÃO DA CURVA PADRÃO.

O pH do meio não é um fator de diferenciação dos dois métodos porque o primeiro apresenta interferência quando o pH do meio é maior que 7,0, e o segundo método não pode ser realizado em meio alcalino pois ocorre precipitação do reagente.

Embora, nos parâmetros avaliados, ambos os métodos atendam os requisitos necessários, sendo por tanto adequados, a escolha do método para a quantificação do ácido kójico depende do sistema ou material onde o ativo está presente e da concentração, tendo em vista que a principal diferença entre eles é a sensibilidade.

5.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA

Para avaliação da qualidade da matéria-prima foram realizados ensaios de identificação, solubilidade, ponto de fusão e determinação do teor. Os resultados foram comparados com a especificação fornecida pelo certificado de análise do produto e por dados na literatura (Tabela 21).

Tabela 21. Parâmetros de qualidade para a matéria-prima.

PARÂMETROS	ESPECIFICADO	RESULTADO
Características Organolépticas e Aspecto	- Pó cristalino, branco-amarelado, insípido e inodoro (1 e 2)	De acordo
Identificação	1. Infravermelho, com característica semelhante ao padrão.	De acordo
	2. Ultravioleta, com característica semelhante ao padrão.	De acordo
	3. Reação com cloreto férrico: cor rósea característica, semelhante ao sistema contendo padrão.	De acordo
Solubilidade	- Solúvel em: água, HCl 0,1M e NaOH 0,1 M.	De acordo
	- Ligeiramente solúvel em: etanol 96 % e acetona.	De acordo
	- Pouco solúvel em: éter e clorofórmio (1)	De acordo
Ponto de Fusão	153°C – 154°C (2)	153,3°C
Teor	98 % – 102 % (2)	a) 98,70 %
		b) 98,93 %

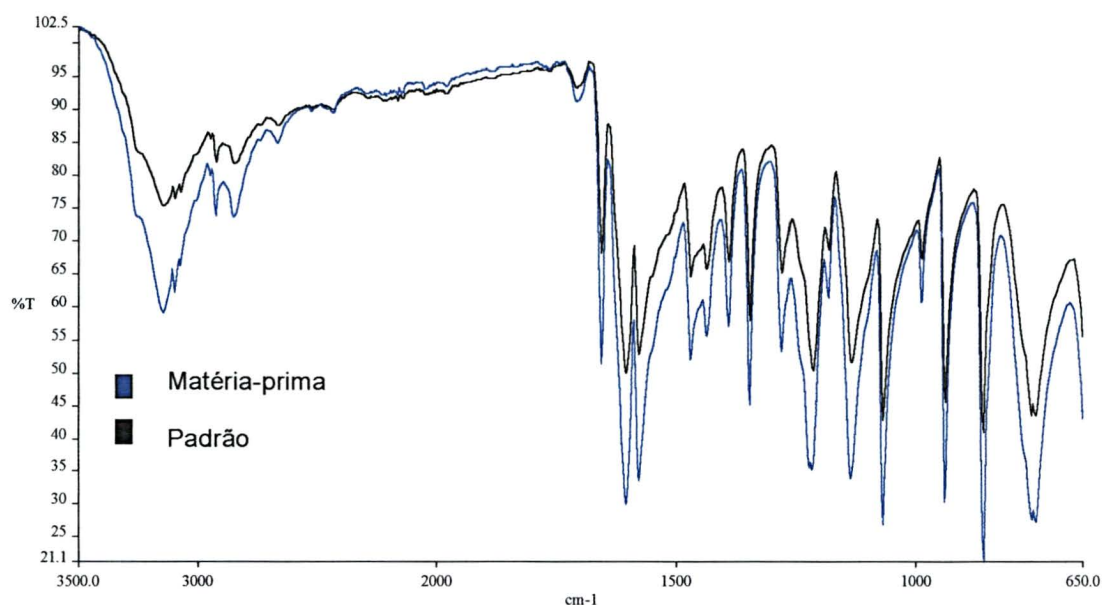
FONTE: O AUTOR

NOTA: (1) CONFORME THE INDEX MERCK, 1983

(2) CONFORME CERTIFICADO DE ANÁLISE (ANEXO)

Legenda: a) método espectrofotométrico no ultravioleta; b) método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico.

O espectro no infravermelho do ácido kójico padrão e da matéria-prima (Figura 27) mostraram bandas de absorção características em regiões semelhantes. Entre essas bandas pode-se destacar: hidroxila em 3100 cm^{-1} ; CH alifático (sp^3) em 2900 cm^{-1} e carbonila em 1650 cm^{-1} .



FONTE: O AUTOR

Figura 27: Espectros de absorção no infravermelho do ácido kójico padrão e da matéria-prima.

O espectro no ultravioleta (Figura 28) também mostra que a matéria-prima e o padrão apresentam pico máximo de absorção no mesmo comprimento de onda. Estes resultados indicam que a matéria-prima e o padrão são a mesma substância.

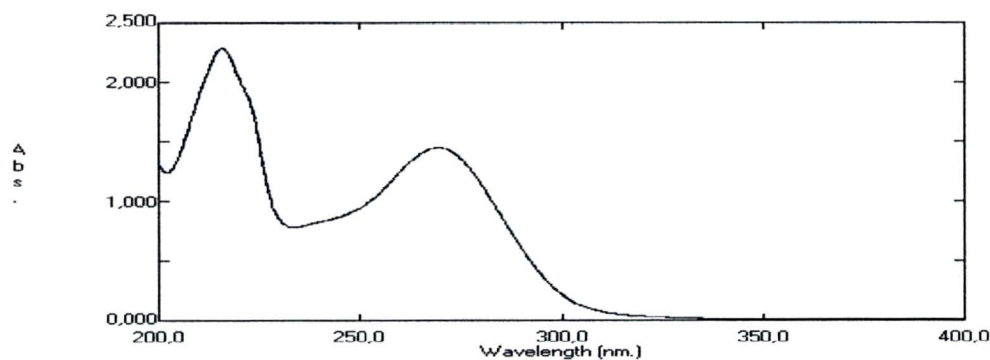


Figura 31: Espectro de absorção no ultravioleta do ácido kójico padrão e da matéria prima nas concentrações de 25 µg/ml, em água.

5.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA FORMULAÇÃO F 4

A formulação F 4 foi analisada quanto suas características organolépticas, aspecto, pH, homogeneidade e teor para avaliação da sua qualidade, conforme a Tabela 22.

Tabela 22. Parâmetros de qualidade para a formulação F 4.

PARÂMETRO	DESEJADO	RESULTADO
Características Organolépticas e Aspecto	Amarelo claro, brilhante e inodoro	De acordo
Homogeneidade	Sem floculação, cremação e inversão de fase	De acordo
pH	5,0 – 6,0	5,37
Teor	Cerca de 2 %	1,92 % *

FONTE: O AUTOR

NOTA: * OBTIDO PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO VISÍVEL PELO CLORETO FÉRRICO.

A formulação F 4 apresentou todos os parâmetros analisados de acordo com o desejado para que seja uma formulação adequada para veicular o ácido kójico (Tabela 22).

5.7 PERMEÇÃO CUTÂNEA

Ao longo da última década, inúmeros pesquisadores foram atraídos a realizar criteriosos estudos, objetivando determinar e entender os fatores farmacocinéticos, físico-químicos e farmacotécnicos, os quais envolvem a ação de produtos dermatológicos.

Uma vez que a administração de produtos medicamentosos pela via cutânea destina-se a obtenção, tanto de uma ação tópica como também sistêmica, é primordial que se tenha uma concreta definição de qual destas ações é desejada, visto que, os critérios para avaliação destes produtos são conceitualmente diferentes. Um produto dermatológico é destinado a liberar o(s) princípio(s) ativo(s) na pele para o tratamento de patologias cutâneas, assim, a pele é o órgão alvo. Do produto dermatológico, portanto, exige-se uma máxima atuação na pele e mínima exposição sistêmica, ou seja, é ideal que se tenha uma ótima retenção do fármaco na pele, com pequeno ou inexistente fluxo através dela (SHAH et al., 1992b).

Nos últimos anos, o ácido kójico tem ocupado uma posição de destaque entre as substâncias usadas para o clareamento de vários tipos de hiperpigmentações cutâneas (ELLIS, TAN, ELLIS, 1995). Entretanto, ao lado da atividade tópica, não existem estudos demonstrando efeitos sistêmicos e colaterais decorrentes de sua absorção através da pele.

Na avaliação de produtos de ação dermatológica e transdérmica, testes clínicos podem ser precedidos, e em algumas vezes substituídos, por testes *in vitro*. Estes testes, devido às suas peculiaridades, permitem entender alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacologicamente, de maneira prática, rápida e sem a interferência de fatores biológicos (WESTER, MAIBACH, 1989).

As colocações feitas acima levaram a avaliação da formulação F 4 (Tabela 10) quanto à capacidade de proporcionar disponibilidade adequada do princípio ativo em nível cutâneo, ou seja, maior retenção cutânea e menor fluxo do mesmo através da pele.

Para tanto, foi utilizada a célula de difusão baseada no modelo de Franz (Figura 6), usualmente empregada em estudos de permeação *in vitro* de produtos tópicos. Neste ensaio manteve-se a temperatura constante (37°C) e agitação magnética suficientemente vigorosa para minimizar as camadas de difusão na interface da membrana, fato este que promoveria uma resistência adicional à difusão do fármaco para a solução receptora (SMITH, HAIGH, 1989), e evitando a obtenção de concentrações localizadas de fármacos.

A eleição de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade do fármaco. Com substâncias de baixa solubilidade em água pode-se obter falsos resultados. Como o ácido kójico é muito solúvel em água, as soluções receptoras mais indicadas são soluções tampão isotônicas com valores de pH em torno de 7,4 e a manutenção de “sink conditions” é necessária para garantir a obtenção de resultados efetivos (WESTER, MAIBACH, 1989).

A membrana é outro fator crítico na condução dos experimentos de permeação *in vitro*. As membranas sintéticas, como as de acetato de celulose, são indicadas para verificação das características de liberação que o veículo proporciona ao fármaco. No entanto, trata-se de uma membrana hidrófila que não possui as propriedades anatômicas e fisiológicas da pele. Assim, o ideal é realizar estes

estudos com membranas naturais (pele humana e de animais). A pele humana decididamente é a mais adequada para estudos *in vitro*. Entretanto, a dificuldade na aquisição deste tecido e a variação biológica levaram ao emprego de peles de animais (BRONAUGH, STEWART, 1986).

A pele da orelha de porco tem sido muito utilizada nos experimentos *in vitro*, apesar de apresentar algumas diferenças anatômicas quando comparada com a pele humana. A viabilidade de aquisição, a melhor uniformidade das amostras, bem como a facilidade de dissecação e separação do tecido subcutâneo, contribuíram para a eleição desta pele da orelha de porco como modelo de membrana para os estudos de permeação (REIFENRATH ET AL., 1984).

Segundo SHAH et al. (1992) quando o material a ser empregado é semi-sólido o espalhamento de uma quantidade finita deste produto dificilmente produziria uma camada uniforme sobre a membrana, por isso nestas situações é aconselhável o uso de uma “dose infinita”, ou seja, um excesso de produto.

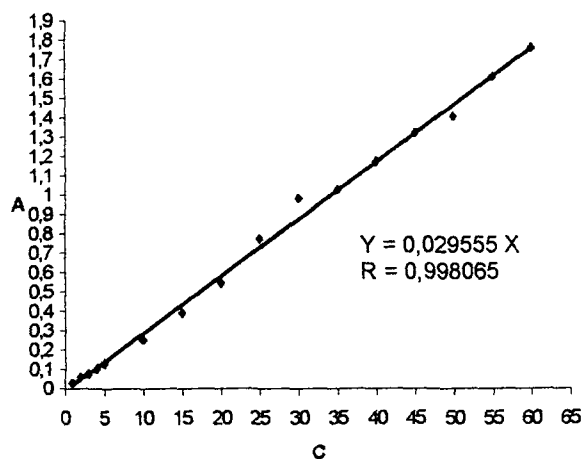
AMERONGEN et al. (1992) utilizaram dose infinita em seus estudos de permeação *in vitro* da budesonida contida em cremes e verificaram que acima de 0,9 mm de espessura de produto sobre a membrana, o perfil de permeação do fármaco não apresentou diferença. Com base nessa evidência, o estudo de permeação foi realizado com doses infinitas.

Para os ácidos fracos com pKa maiores que 7,5 e bases com pKa menores que 5, a absorção cutânea é independente do pH (PRISTA, BAHIA, VILAR, 1992). Deste modo o pKa do ácido kójico é de 7,9 a 8,03 e possivelmente o pH do meio não influi na permeação.

A base dos experimentos *in vitro* de permeação cutânea é determinar as pequenas quantidades de fármaco que atravessam as membranas ou que ficam retidos nas mesmas. A utilização de um método analítico sensível o qual viabilizasse o experimento foi de extrema importância. Entre os dois métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação do ácido kójico o método espectrométrico no ultravioleta mostrou-se mais sensível que o método colorimétrico por cloreto férrico. No entanto, como já discutido, o método espectrométrico no ultravioleta não é adequado quando a formulação apresenta o conservante metilparabeno em sua constituição. Para evitar que os resultados obtidos fossem equivocados foi utilizada a formulação F 4 isenta de conservante no estudo de permeação *in vitro*.

Definida a metodologia de quantificação do ácido kójico, o estudo de permeação foi conduzido.

Para a determinação da quantidade de ácido kójico permeada foi utilizada uma curva padrão de ácido kójico em tampão fosfato isotônico pH 7,4, obtida em comprimento de onda de 269 nm, conforme pode ser observada na Figura 29.



FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; C = Concentração de ácido kójico (µg/ml); n = 9; λ = 269 nm; Branco = Solução tampão fosfato isotônica pH 7,4.

Figura 29: Representação gráfica da curva padrão de ácido kójico em solução tampão fosfato isotônica pH 7,4.

A Tabela 23 mostra os resultados da permeação do ácido kójico através da pele da orelha de porco.

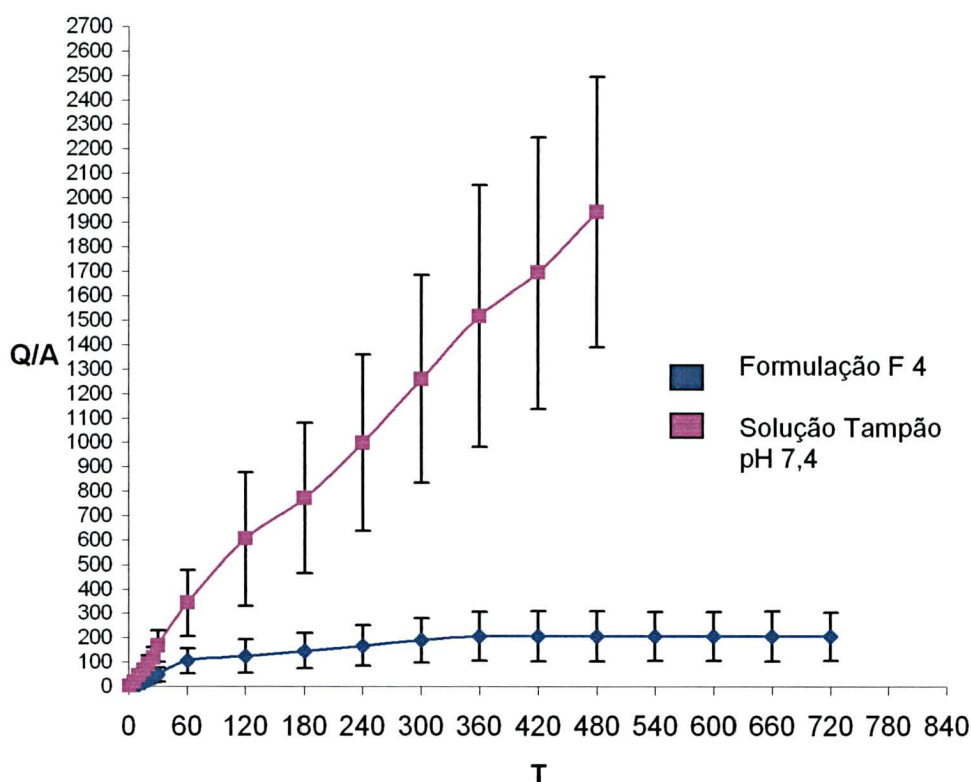
Tabela 23. Resultados de permeação cutânea do ácido kójico através da pele da orelha de porco.

Tempo de Permeação (minutos)	Formulação F 4	Solução Tampão Fosfato pH 7,4
	Quantidade Permeada/Área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm Desvio Padrão	
0	0 \pm 0	0 \pm 0
5	0 \pm 0	15,0356 \pm 8,9724
10	4,4943 \pm 2,3264	42,8048 \pm 23,8467
15	12,5078 \pm 6,0947	66,8175 \pm 24,4639
20	24,1347 \pm 13,6789	87,6331 \pm 38,0251
25	34,8878 \pm 18,8362	115,3157 \pm 47,0367
30	48,0875 \pm 29,3153	165,3106 \pm 63,8456
60	104,8198 \pm 52,3485	342,1763 \pm 136,4563
120	125,2495 \pm 68,5456	603,8286 \pm 272,5783
180	146,0940 \pm 72,0042	771,8388 \pm 308,0936
240	167,7364 \pm 83,0926	999,1512 \pm 361,4658
300	189,6518 \pm 91,6132	1260,1063 \pm 424,7352
360	206,6426 \pm 100,6478	1518,7368 \pm 535,3562
420	206,0733 \pm 101,8948	1694,9661 \pm 556,4768
480	205,9968 \pm 102,7346	1945,3784 \pm 553,3520
540	206,2944 \pm 101,0283	
600	206,5078 \pm 101,0127	
660	206,5259 \pm 103,99 64	
720	205,5469 \pm 98,8677	

FONTE: O AUTOR

A quantidade de ácido kójico permeado através da membrana foi significativamente maior na solução tampão fosfato pH 7,4 do que na formulação F 4 (Tabela 23). Isto ocorre por que o perfil de permeação existente no sistema é diferente para cada produto (Figura 30).

Apesar do perfil de permeação do ácido kójico presente na formulação F 4 demonstrar que o fluxo estabilizou após 360 minutos (6 horas), caracterizando um produto dermatológico, ou seja, à medida que a concentração do ativo diminui, o fluxo tende a diminuir também. Pode-se verificar que a quantidade de fármaco permeado é muito pequena em relação ao conteúdo da formulação, indicando que não houve esgotamento do fármaco no produto (Figura 30).



FONTE: O AUTOR

Legenda: T = Tempo (minutos); Q/A = Quantidade de ácido kójico permeado por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), n = 4 (Média \pm SD).

Figura 30: Perfil do fluxo de permeação do ácido kójico através de pele da orelha de porco.

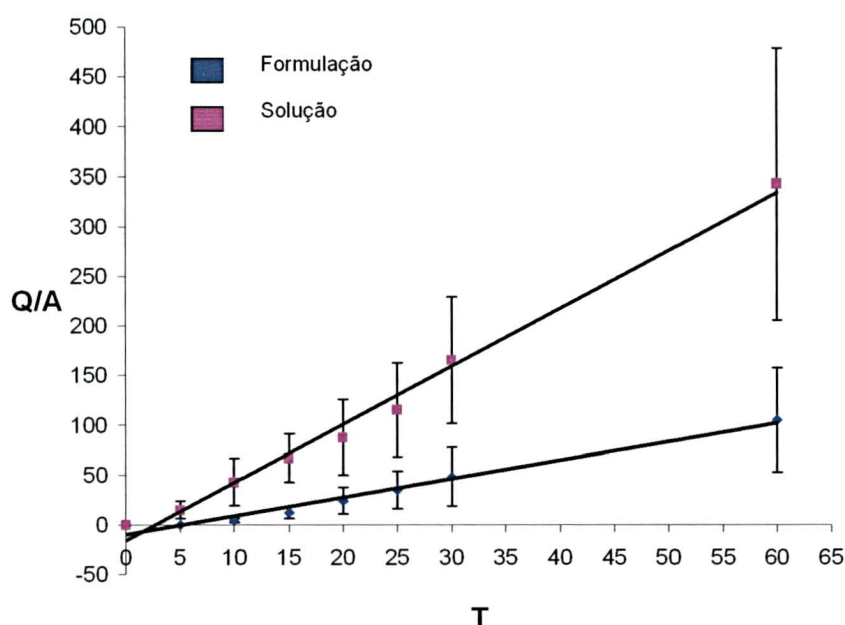
Estas alterações no fluxo possivelmente estejam ocorrendo devido à uma diferença na cedência do ativo. Provavelmente ocorre maior permeação do fármaco que está em contato direto com a membrana e permeação diferente do que não está em contato com ela.

No perfil de permeação do ácido kójico presente na formulação observa-se que o fluxo permanece contínuo, demonstrando que existe quantidade infinita sendo fornecida à membrana e que a velocidade de cedência do ativo provavelmente se mantém constante (Figura 30).

Como as velocidades de cedência, e conseqüentemente de permeação, variam de acordo com as características da formulação, foi observado um aumento

no tempo necessário para que o fluxo se equilibre (tempo LAG) da emulsão F4 em relação a solução tampão fosfato isotônica pH 7,4 (Figura 31) (SHAH et al., 1992).

O tempo LAG da formulação F 4 foi de 8 minutos enquanto que a solução tampão demorou apenas 3 minutos para atingir um fluxo constante (Figura 31). A partir do início da permeação uniforme é possível definir a cinética de permeação cutânea do produto (BRONAUGH, MAIBACH, 1999).



FONTE: O AUTOR

Legenda: T = Tempo (minutos); Q/A = Quantidade de ácido kójico permeado por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), n=4 (Média \pm SD).

Figura 31: Representação gráfica para determinação do tempo LAG do ácido kójico na formulação F 4 e em solução tampão fosfato isotônica pH 7,4 nos ensaios de permeação cutânea.

A Tabela 24 relaciona os parâmetros cinéticos de permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico presente nas duas formulações em estudo através do modelo de HIGUCHI (pseudo 1ª. ordem), do modelo de cinética de 1ª. ordem e do modelo de cinética de ordem zero.

Tabela 24. Parâmetros cinéticos das curvas de permeação *in vitro* do ácido kójico nas formulações em estudo.

Formulação	Modelo Higuchi		Cinética de ordem zero		Cinética de 1ª. ordem	
	J ($\mu\text{g/ml/cm}^2$)	r	J ($\mu\text{g/ml/cm}^2$)	r	J ($\mu\text{g/ml/cm}^2$)	r
F 4 – até 1 hora	14,8622	0,962952	1,196353	0,989118	0,064947	0,9570
F4 – de 1 a 8 horas	81,591	0,994313	29,7171	0,930774	0,27098	0,70399
Solução tampão Fosfato pH 7,4	0,101	0,970742	4,03904	0,998334	876,1946	0,98892

FONTE: O AUTOR

Legenda: J = Fluxo; r = coeficiente de correlação linear.

Como pode-se verificar o modelo cinético de ordem zero apresentou um maior coeficiente de correlação ($r = 0,989118$) para a formulação F 4, no período de até 1 hora, indicando que o fluxo, neste intervalo, independe da concentração do ativo. Este modelo cinético é característico de formulações com doses infinitas (WESTER, MAIBACH, 1989).

Porém, após a primeira hora o sistema sofreu uma alteração na cinética, passando a ser de pseudo 1ª. ordem (modelo de HIGUCHI), conforme mostra o coeficiente de correlação ($r = 0,994313$) na Tabela 24. Este modelo cinético, comum em suspensões, determina que o fluxo depende da concentração do ativo disponível, deste modo verifica-se que ocorreu um esgotamento do fármaco em contato com a membrana, passando a permear o fármaco em suspensão na formulação (CHOW, KAKA, WANG, 1984).

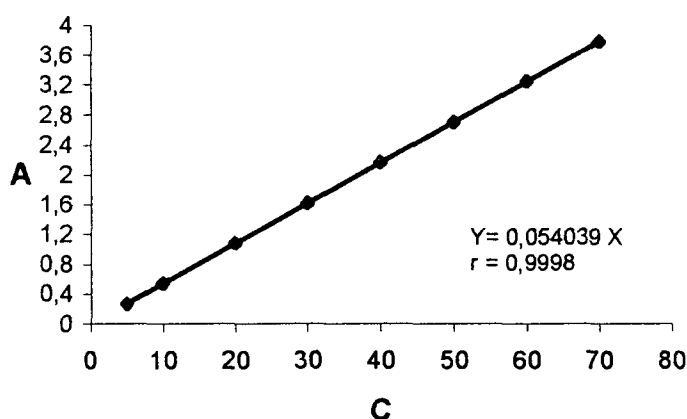
Em relação à solução tampão, observa-se que esta apresenta coeficiente de correlação ($r = 0,998334$) maior para a cinética de ordem zero (Tabela 24). Este resultado condiz com a quantidade de fármaco presente na solução tampão e com o fato deste estar solúvel no meio (FLYNN, 1989), não alterando o fluxo com o decorrer do tempo (Figura 31).

Nos estudos *in vitro* de produtos dermatológicos é importante considerar que as concentrações de fármacos na solução receptora, por si só, não refletem a influência da formulação na atividade do produto. Assim, a determinação da quantidade de fármaco retido na membrana leva a dados mais concretos, os quais podem elucidar o grau de atividade tópica do produto (MASINI et al., 1993).

5.8 RETENÇÃO CUTÂNEA

A determinação por espectrometria no ultravioleta do ácido kójico retido na pele da orelha de porco foi realizada após a extração direta com metanol. Este procedimento apresentou-se adequado uma vez que o ativo é solúvel em metanol e os componentes da pele, que por sua vez foram extraídos, não interferiram no método analítico.

A curva padrão do ácido kójico em metanol, representada na Figura 32, foi obtida a 269 nm, para a determinação do teor de ácido kójico retido.



FONTE: O AUTOR

Legenda: A = Absorvância; C = Concentração de ácido kójico (µg/ml); n = 6; Branco = metanol

Figura 32: Representação gráfica da curva padrão do ácido kójico em metanol.

As tabelas 25 e 26 mostram os valores de retenção cutânea do ácido kójico por grama de pele na formulação F 4 e na solução tampão fosfato isotônica pH 7,4.

Tabela 25. Retenção cutânea do ácido kójico da formulação F 4.

Pele	Quantidade Retida (µg)	Peso da pele (g)	Quantidade Retida (µg)/ g de pele	Média (µg/g) ± SD
1	1367,5	0,033	41439,39	39852,51 ± 1510,40
2	1422,0	0,037	38432,43	
3	1389,0	0,035	39685,71	

FONTE: O AUTOR

NOTA: COMO BRANCO FOI UTILIZADA UMA FORMULAÇÃO ISENTA DE ÁCIDO KÓJICO

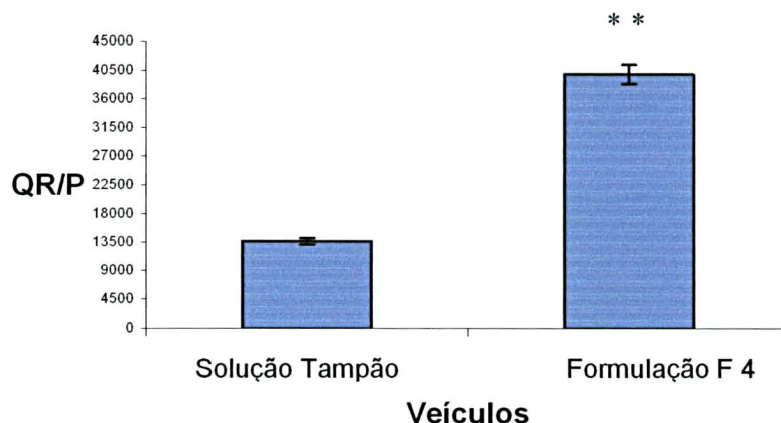
Tabela 26. Retenção cutânea do ácido kójico da solução tampão fosfato isotônico pH 7,4.

Pele	Quantidade Retida (µg)	Peso da pele (g)	Quantidade Retida (µg)/ g de pele	Média (µg/g) ± SD
1	495,29	0,035	14151,14	13643,95 ± 479,77
2	489,00	0,036	13583,33	
3	501,50	0,038	13197,37	

FONTE: O AUTOR

NOTA: COMO BRANCO FOI UTILIZADA UMA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO ISOTÔNICA pH 7,4 ISENTA DE ÁCIDO KÓJICO

A formulação F 4 promoveu uma maior retenção cutânea que a solução tampão, como pode ser observado na Figura 33.



FONTE: O AUTOR

NOTA: ** $p < 0,01$

Legenda: QR/P = Quantidade de ácido lático retido / grama de pele ($\mu\text{g/g}$), $n=9$ (Média \pm SD); $\lambda = 269 \text{ nm}$.

Figura 33: Quantidade de ácido lático retido na pele da orelha de porco após oito horas de contato com os veículos.

A solução tampão fosfato pH 7,4 apresentou uma retenção cutânea menor (Figura 33) possivelmente devido ao fato desta não possuir nenhuma lipofilia, dificultando a interação do produto com os lipídios presentes na pele (SETHI, AGHA, 1993).

No entanto, com a formulação F 4 houve retenção cutânea significativamente maior em comparação à solução tampão fosfato pH 7,4. Isto ocorreu provavelmente porque os componentes de uma emulsão, por exemplo os tensoativos e os lipídios, apresentam afinidade e/ou interação com os constituintes da membrana, demonstrando as vantagens deste tipo de formulação para produtos de uso dermatológico (PRISTA, BAHIA, VILAR, 1992).

A contribuição do estudo de permeação *in vitro* na avaliação de propriedades farmacocinéticas de formulações e no desenvolvimento farmacotécnico é inquestionável, pois representa um procedimento prático, rápido e de baixo custo. Os estudos *in vitro* também encontram aplicação no controle de qualidade de uniformidade de lotes de produtos dermatológicos na indústria farmacêutica.

Entretanto, deve-se ter a cautela quanto à extrapolação dos resultados obtidos para situações *in vivo*. Com a metodologia *in vitro* pode-se fazer uma seleção prévia das formulações antes da realização de testes clínicos.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir:

- A metodologia de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta apresentou linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão intra-dia e inter-dias e robustez para soluções aquosas com pH abaixo de 7,5.
- A metodologia de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no visível pelo cloreto férrico apresentou linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão intra-dia e inter-dias e robustez. Porém, não pode ser utilizada em pH alcalino, pois ocorre precipitação do ferro na forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$.
- O método espectrofotométrico no visível pelo cloreto férrico apresentou menor sensibilidade que o método espectrométrico no ultravioleta. Porém, este tem limitações de uso quando o ativo e o conservante metilparabeno são utilizados concomitantemente na forma farmacêutica, pois apresentam absorções características na mesma faixa de comprimento de onda.
- O ácido kójico matéria-prima satisfaz todos os parâmetros de qualidade analisados, quando comparados ao especificado na literatura e/ou pelo certificado de análise do fornecedor.
- A formulação F 4 apresentou dois comportamentos cinéticos. No período de até 1 hora há um fluxo com característica cinética de ordem zero e no período de 1 a 8 horas cinética de pseudo 1ª. ordem. Isto possivelmente ocorreu porque em um primeiro momento o ativo encontra-se em contato direto com a membrana e nas horas subsequentes o fluxo é dependente também da difusão do ativo na própria formulação.

- Em solução tampão pH 7,4, o ácido kójico apresentou um fluxo pela membrana característico de cinética de ordem zero. Isto provavelmente ocorreu porque todo o ativo está solubilizado no meio e conseqüentemente disponível para a permeação.
- Comparando as cinéticas da formulação F 4 com a da solução tampão pH 7,4 verifica-se a vantagem do uso da formulação F 4 devido a permeação desta ser menor.
- A formulação F 4 apresentou maior retenção cutânea em comparação com a solução tampão pH 7,4, possivelmente devido a maior interação de seus componentes com a membrana.
- A formulação F 4 mostrou-se adequada para veicular o ácido kójico, pois apresentou as características desejáveis de um produto para uso tópico, ou seja, uma grande retentividade e uma pequena permeabilidade.

REFERÊNCIAS

- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica, formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000, p. 300-301.
- AMINI, E.K., HERNÁNDEZ, H.V. Hiperpigmentação cutânea. In: GODOY, R. **Dermatologia**. Caracas: Venezuelana, v. 1, 1995, p.293-298.
- AMEROGEN, I. A., RONDE, H. A. G., KOOSTER, N. T. M. Physico-chemical characterization of semisolid topical dosage form using a new dissolution system. **Int. Pharm.**, Amsterdam, v. 86, p.9-15, 1992.
- ARCHIPRE, B. Os glicocitratos: sua utilização em estética. **Up to Date**, São Paulo, v. 2, n. 8, p.36-37, 1996.
- BAE, Y. H., KIM, S. W. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block co-polymers on interpenetrating networks. **Adv. Drug. Del. Rev.**, Amsterdam, v. 11, n. 1-2, p.109-135, 1993.
- BARRY, B. W. **Dermatological Formulations. Percutaneous absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983, p.1-233, 351-407.
- BARRY, B. W. Transdermal drugs delivery. In: JOHNSON, P., LLOYD-JONES, J. G. **Drug Delivery Systems** (Fundamental and Techniques). Chichester, Ellis Horwood, 1987, p. 200-230.
- BECHELLI, L. M., CURBAN, G. V. **Compêndio de dermatologia**, São Paulo: Atheneu, 1988, p. 2-503.
- BERND, A. et al. Level of dopachrome tautomerase in human melanocytes cultured "in vitro". **Melanoma Res.**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 287-291, 1994.
- BEZERRA, S. V., REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. São Paulo: SENAC, 1996. p.46,65,74,78,80-82.
- BOTTARI, F. et al. Release of drugs from ointment bases II: In vitro release of benzocaine from suspension-type aqueous gels. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 66, n. 7, p. 926-931, 1977.
- BOYLE, J., KENNEDY, C.T.C. Hydroquinone concentrations in skin lightening creams. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 114, n. 4, p. 501-504, 1986.
- BRONAUGH, R. L., CONGDON, E. R., SCHEUPLEIN, R. J. The effect of cosmetic vehicles on the penetration of N-nitrosodiethanolamine through excised human skin. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 76, n. 2, p.94-96, 1981.

BRONAUGH, R. L., STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. **J. Pharm.Sci.**, Washington, v. 73, n. 9, p.1255-1258, 1983.

BRONAUGH, R.L., STEWART, R. F., CONGDON, E. R. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies II: Animal models for human skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 62, p. 481-488, 1982.

BRONAUGH, R. L., STEWART, R. F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 74, n. 1, p. 64-67, 1985.

BRONAUGH, R. L., STEWART, R. F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV: preparation of the barrier layer. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 75, n. 5, p. 487-491, 1986.

BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption: Drugs - Cosmetics – Mechanisms - Metodology**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, v. 97, 1999.

BULENGO-RANSBY et al. Topical tretinoin (retinoic acid) therapy for hyperpigmented lesions caused by inflammation of the skin in black patients. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 329, n. 20, p.1438-1443, 1993.

BUSSE, M. J. et al Release of betamethasone derivatives from ointment - in vitro studies. **Br. J. Dermatol.**, Suppl., Oxford, v. 81, p.103-112,1969.

CABANES, J., CHAZARRA, S., GARCIA CARMONA, F. Kojic acid a cosmetic skin whitening agent, is a slow – binding inhibitor of catecholase activity of tirosinase. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 46, n. 12, p.982-985, 1994.

CASTRO, C.C.A., PIMENTA, C.L., DORANE, I. Tratamento da hiperpigmentação:uva ursina versus hidroquinona. **Comest. Toiletries**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 39-43, 1997.

CAPPEL, M. J., KREUTER, J. Effect of noionic surfactants on transdermal drug delivery: Polysorbates. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 69, p.143-153, 1991.

CAMPOS, P. M. B. G. Bases dermocosméticas. **Cosmiatria e Medicina Estética**, v. 2, n. 2, p. 32-35, 1994.

CAMPOS, P. M. B. G. Manipulação magistral no tratamento das discromias. **Cosmiatria e Medicina Estética**, v. 2, n. 2, p. 35-39, 2001.

CARMINI, M. A., KURAHASSI, R. C. Estudo da estabilidade da viscosidade de emulsões não iônicas, compostas por diferentes emulsionantes e co-emulsionantes, em função do tempo. **Racine**, p. 38-40, 1995.

CHARLET, E. **Cosmetica para farmacêuticos**. Zaragoza: Acribia, p.119-123, 1996.

CHASIN, A. A. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral, **Rev. Bras. de Toxicol.**, vol. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

CHEDEKEL, M.R., ZEISE, L. Melanina: novo ingrediente cosmético. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 40-43, 1996.

CHOW, D. S. L., KAKA, I., WANG, T. I. Concentration-dependent enhancement of 1-dodecylazacycloheptan-2-one, on the percutaneous penetration kinetics of triamcinolone acetone. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 73, n. 12, p. 1794-1799, 1984.

CHOWHAN, Z. T., PRITCHARD, R. Release of corticoids oleaginous bases containing drugs in suspension. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 64, n. 5, p. 754-759, 1975.

CRODA DO BRASIL, Crodamol CGTCC®. Campinas. 2001, p. 2 [Catálogo].

CRODA DO BRASIL, Polawax®. Campinas. 2001, p. 2 [Catálogo].

DAHMAS, G. Emulsões O/A com fases lamelares anisotrópicas. **Cosmet. Toiletries**, p. 43-45, 1991.

DAMONTE, S.P et al. Ácido glicólico: su utilización en cosmética y dermatología como un exponente de cosmeceútico. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12., 1995, São Paulo. Anais. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1995, p.1-3.

DE VOS, F. et al. Percutaneous absorption of indomethacin from transparent oil/water gels in rabbits. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p.237-241, 1991.

DUGGAN, M. Tirosinase, a enzima envolvida no bronzimento. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v. 1, n. 3, p.28-32, 1989.

DÜRRHEIM, H. et al. Permeation of hairless mouse skin I: Experimental methods and comparison with human epidermal permeation by alkanols. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 69, n. 7, p.781, 1980.

ELLIS, D. A. F., TAN, A. K.W., ELLIS, C.S. Superficial micropeels: glycolic acid and alpha-hydroxy acid with kojic acid. **F. P. Surg.**, New York, v. 11, n. 1, p.15-21, 1995.

ERICKSON, C. From the crest to periphery control of pigment cell migration and lineage segregation. **Pigm. Cell Res.**, New York, v. 6, p. 336-347, 1993.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FLYNN, G. L. Mechanism of percutaneous absorption from physicochemical evidence. In: BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1989, p. 37.

FLYNN, G. L., DÜRRHEIM, H., HIGUCHI, W. I. Permeation of hairless mouse skin II: Membrane sectioning techniques and influence on alkanol permeabilities. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 70, n. 1, p. 52-56, 1981.

FONSECA, A. ., PRISTA, L.N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmética**. São Paulo: Rocca, 1984. p.161-162.

FONSECA, A., SOUZA, E.M. **Dermatologia Clínica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1986, p.281-293.

FOX, C. Advances in cosmetic science and technology. IV. Skin care and treatment. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 110, p. 63-93, 1995.

FOX, C. OTC Skin care products. **Cosmet. Toiletries**. Oak Park, v. 111, p. 105-128, 1996.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

GARCIA, A. ., FULTON, J.E. The combination of glycolic acid and hidroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. **Dermatol. Surg.**, New York, v. 22, n. 5, p. 443-447, 1996.

GASCO, M. R., GALLARTE, M., PATTARINO, F. *In vitro* permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. **Int. J. Pharm.**, Amstradam, v. 69, p.193-196, 1991.

GASCO, M. R., GALLARTE, M., PATTARINO, F. On the release of prednisone from oil water microemulsions. II **Farmaco**, Pavia, v. 43, n. 10, p.325-330, 1988.

GASCO, M. R., TROTTA, M., CALOTTI, M. E. Effects of carboxilic acids on permeation of chlorpromazine through dimethyl polysiloxane membrane. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 71, n. 2, p.239-241, 1982.

GHOSH, T. K., CHIAO, C. S., GOKHALE, R. D. In vitro permeation of some β -blockers across the hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 45, p. 218-219, 1993.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GUMMER, C. L., HINZ, R. S., MAIBACH, H.I. The skin penetration cell: a design update, **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 40, p.101-104, 1987.

HADGRAFT, J., BEUTNER, D., WOLFF, H. M. *In vivo- in vitro comparisons in the transdermal delivery of nitroglycerin. Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 89, 1993.

HADGRAFT, J., RIDOUT, G. Comparison between two *in vitro* methods for determining percutaneous absorption. *J. Pharm. Pharmacol.*, Suppl., London, v. 37, p.75, 1985.

HATANAKA, T et al. Prediction of skin permeability of drugs. II Development of composite membrane as skin alternative. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 79, p.21-28, 1992.

HOLLAND, J. M., KAO, J. Y., WHITAKER, M. J. A multisample apparatus for kinetic evaluation of skin penetration *in vitro*: the influence of viability and metabolic status of the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v. 72, 272-280, 1984.

HORI, M., SATOH, S., MAIBACH, H.I., GUY, R.H. Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption *in vitro*: effect of enhancer lipophilicity. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 80, n. 1, p. 32-35, 1991.

HUNT, G et al. Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes, *Pigm. Cell Res.*, New York, v.8, p. 202-208, 1995.

ICH (1995) Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Methodology. International Conference on Harmonisation, 29 November 1995.

ICPQ CUTINA DSP-6B®. São Paulo. P. 1, 1999 [Catálogo].

ICPQ EMULGADE WAX®. São Paulo. P. 1, 1999 [Catálogo].

ITO, A. S., CRIPPA, P.R. Effects of UV irradiation and various chemical conditions on oxidations on oxidation of NADH by pheomelanins. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, New York, v.17, p. 205-209, 1985.

JATO, J. L. V. **Tecnologia farmacêutica**. Madrid: Editorial Síntesis, 2000, p. 260-290.

KAMEYAMA, K et al. Inhibitory effect of magnesium L- ascorbil – 2 – phosphate (VC-PMG) on melanogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v. 34, n. 1, p. 29-33, 1996.

KNECZKE, M. et al. *In vitro* release of salicylic acid from two different qualities of white petrolatum. *Acta Pharm. Suec.*, Stockholm, v. 23, n. 4, p.193-204, 1986.

KUBOTA, K., KOYAMA, M., TWIZELL, H. I. Percutaneous absorption: a single-layer model. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 5, p.450-456, 1993.

KUROSAKI, Y et al. Use of lipid disperse systems in transdermal drugs delivery: comparative study of flufenâmico acid permeation among rat abdominal

skin, silicon rubber membrane and stratum corneum sheet isolated from hamster cheek pouch. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 67, p. 1-9, 1991.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2001, p. 855-904.

LAWRENCE, N., COX, S.E., BROADY, H.J. Treatment of melasma with Jessner's solution versus glycolic acid: a comparison of clinical efficacy and evaluation of the predictive ability of wood's light examination. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Saint Louis, v. 36, n. 4, p. 589-593, 1997.

LEE, O.S., KIM, E.J. Skin lightening. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 110, n. 10, p. 51-56, 1995.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Editora Átomo, 4 ed., 2002.

LEONARDI, G.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Substâncias ativas em dermatologia. **Rev. Racine**, São Paulo, v.7, n. 36, p.11-13, 1997.

LIDA, K et al. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 61, n. 5, p. 425-428, 1995.

LOWER, E. Formulate with fruit acids for healthy skin. **Manuf. Chem.**, London, v. 66, p. 33-35, 1995.

MAEDA, K., FUKURA, M. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v. 42, p. 361-368, 1996.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Manipulação magistral no tratamento de discromias. **Cosmiatr. Méd. Estét.**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 35-39, 1995.

MASINI, V et al. Cutaneous bioavailability on hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82, n. 1, p. 17-21, 1993.

MASUDA, M., TEJIMA, T., SUZUKI, T. Skin Lighteners. **Cosmt. Toiletries**, Oak Park, v. 111, n. 10, p. 65-74, 1996.

MATSUDA, H., NAKAMURA, S., KUBO, M. Studies of cuticle drugs from natural sources. Inhibitory effects of prunus plants on melanin biosynthesis. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.10, n.17, p.1417-1420, 1994.

MENE, R et al. Ácido fítico, um novo clareante da pele humana, **Up to Date**, São Paulo, v. 2, n. 12, p. 6-7, 1996.

MENTER, M.J. et al. *In vivo* depigmentation by hydroxybenzene derivatives. **Melanoma Res.**, Oxford, v. 3, p. 433-439, 1993.

MICHNIAK, B. B., CHAPMAN, J. M., SEYDA, K. L. Facilitated transport of two models steroids by esters and amides of clofibrilic acid. **J. Pharm. Sci.**, Washinton, v. 82, n. 2, 214-219, 1993.

MOLLGAARD, B., HOELGAARD, A. Vehicle effect on topical drug delivery II. Concurrent skin transport of drug and vehicle components. **Acta Pharm. Suec.**, Stockolm, v. 20, p. 443-450, 1983.

NAPOLITANO, A. et al. 2-aryl-1,3-thiazolidines as masked sulhudryl agents for inhibitin of melanogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1073, p. 416-422, 1991.

NEUBERT, R et al. A multiplayer membrane system for modeling drug penetration into skin. **Int J. Pharm.**, Amsterdam, v. 75, p. 89-94, 1991.

NORDLUND, J.J. et al. Pigment cell biology: an historical review. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 92, n. 4, p. 595-605, 1989.

OKAMOTO, H., HASHIDA, M., SEZAKE, H. Effect of 1-alkyl-or 1-alkenylazacycloalkanone derivatives on the penetration of drugs whit differents lipophilicities through guinea pig skin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 80, n. 1, p. 39-45, 1991.

OLSZEWSKI, Z., KUBIS, A. Examination on the liberation process of active substances from ointment by means of the authors' construction apparatus. **Acta Polon. Pharm.**, Warszawa, v. 26, n. 5, p. 440-449, 1969.

ORTONE, J.P. The effects of ultra violet exposure on skin melanin pigmentation. **J. Int. Med. Res.**, Northampton, v. 18, n. 3, p. 8c-17c, 1990.

OZEKI, H., ITO, S., WAKAMATSU, K. Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair. **Pigm. Cell Res.**, New York, v. 9, p. 51-57, 1996.

PALUDETTI, A. L. Formulando em dermocosmética. **Cosmet. Toiletries**, v. 7, 1995.

PATHAK, M. A. et al. Evaluation of the effectiveness of azelaic acid as a depigmenting and chemotherapeutic agent. **J Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 83, p. 222-228, 1985.

PAWELEK, J.M. et al. Ultraviolet light and pigmentation of the skin. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 107, n. 11, p. 61-67, 1992.

PENTAFARMA. **Melawhite**. Basel: s.n., 1997 (a), 22p. [Catálogo]

PENTAFARMA. **Melfade**. Basel: s.n., 1997 (b), 25p. [Catálogo]

PEREIRA, E. A. **A transformação maligna está associada à perda da resposta de melanócitos humanos ao α - MSH?** São Paulo: 1997.

PEREIRA, J.C. Despigmentantes cutâneos. **Cosmiatr. Méd. Estét.**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 6-12, 1993.

PRÍBORSKÝ, J., MÜHLBACHOVÁ, E. Evaluation of *in vitro* percutaneous absorption across human skin and in animal models. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 42, p. 468-472, 1990.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**, v. I;II;III. 4.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, p. 1991.

PRISTA, L. N.; BAHIA, F. G. M.; VILAR, E. **Dermofarmácia e cosmética**. Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1992, p. 145-150.

PROTA, G. Melanins and melanogenesis. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 111, n. 5, p. 43-51, 1996.

QUIROGA, M.L., GUILLOT, C.F. **Cosmética dermatological practica**. 5.ed. Buenos Aires: Ateneo, 1986, 317p.

REGNIER, M. et al. Barrier of human skin and human reconstructed epidermis. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82, n. 4, p. 404-407, 1993.

REIFENRATH, W.G. et al. Percutaneous penetration in the hairless dog, weanling pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 27, p. 123-135, 1984.

RIEGER, M. Teste de estabilidade para microemulsões, **Cosmet. Toiletries**, v. 8, p. 47-53, 2000.

ROLLAND, A. et al. Influence of formulation, receptor fluid, and occlusion, on *in vitro* drug release from topical dosage forms, using an automated flow-through diffusion cell. **Pharm Res.**, New York, v. 9, n. 1, p. 82-93, 1992.

ROUGIER, A. et al. *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 81, n. 3, p. 275-278, 1983.

ROY, S. D., ROOS, E., SHARMA, K. Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 83, n. 2, p. 126-130, 1994.

SAMPAIO, A. C. Influência dos emolientes no comportamento das emulsões. **Cosmet. Toiletries**, p. 7-8, 1997.

SAMPAIO, A. C. Curso preparações farmacêuticas para o tratamento das discromias, hipo e hiperpigmentações da pele. **Consulcon**, p. 10-18, 1988.

SANCTIS, D. S. Emulsões aspectos técnicos e práticos para o desenvolvimento de formulações. **Racine**, p. 51, 2000.

SANCTIS, D. S. Emulsões para uso externo, **Racine**, v. 53, p. 53-63, 1999.

SASAKI, H. et al. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolone, acetone, indomethacin and flubiprofen. **J. Pharm Sci.**, Washington, v. 80, n. 6, p. 533-538, 1991.

SATO, K., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicoradil. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 80, n. 2, p. 104-107, 1991.

SCHEUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosmet. Toiletries**, v. 12, p. 71-74, 2000.

SCHEUPLEIN, R.J. et al. Percutaneous absorption of steroids. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 52, n. 1, p. 63-70, 1969.

SCHUMANN, R. *In vitro* absorption of butylated hydroxyanisole through human skin. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v. 42, n. 5, p. 335-340, 1991.

SCOTT, R. C., RAMSEY, J. D. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* percutaneous absorption of a lipophilic molecule (Cypermethrin, a pyrethroid insecticide). **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 89, n. 2, p. 412-416, 1987.

SEARLY, R.C. et al. Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions. **Free Radical Biol.**, New York, v. 4, p. 209-259, 1980.

SETHI, P. K., AGHA, B. J. *In vitro* human cadaver skin retention and penetration of a lipophilic compound. **Pharm. Res.**, Suppl., New York, v. 10, n. 10, PDD 7309, 1993.

SHAH, V. P. et al. Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 82, p. 21-28, 1992 (a).

SHAH, V. P., ELKINS, J., SKELLY, J. P. Relationship between *in vivo* skin blanching and *in vitro* release rate for betamethasone valerate creams. **J. Pharm Sci.**, Washington, v. 81, n. 1, p. 104-106, 1992 (b).

SHAP, J. **Quality in manufacture of medicines and other healthcare products**. Part 5: Quality control. London: Pharmaceutical Press, 2000, p. 283-358.

SILVA, E. C., SOARES, I. D. Tecnologia de emulsões, **Cosmet. Toiletries**, v. 8, p. 37-45, 1996.

SMITH, E. W., HAIGH, J. M. *In vitro* systems for assessment of drug release from topical formulations and transmembrane permeation. In: BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. **Percutaneous Absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1989, p. 465-508.

SOLOMOS, T. W. G. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, v. 3, p. 715-738, 1994.

STEINER, D. Discromias. Pt.1: generalidades. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 31-32, 1996 (a).

STEINER, D. Pigmentação e pele. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 30-32, 1996 (b).

STUPAR, M., VULETA, G., PRIMORAC, M. Comparative examination of the release of the salicylic acid from microemulsive gel and excipients lanacoli aquosum. **Pharmazie**, Berlin, v. 41, n. 7, p. 514, 1986.

SUBER, C., WILHERLM, K. P., MAIBACH, H. I. *In vitro* pharmacokinetics of acitretin: percutaneous absorption studies in intact and modified skin from three different species using different receptor solutions. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 836-840, 1991.

TAKENOUGH, K. et al. Fosfato de ascorbil magnésio em preparações dermatológicas. **Cosmiatr. Méd, Estét.**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 36-42, 1994.

TAUBER, U., TODA, T. Biotransformation of Diflucortolon- vareriato in hairless mouse membrane. **Arzneim-Forsch**, Aulendorf, v. 26, n. 7b, p. 1484-1487, 1976.

TELLES, F.R. Novo despigmentante. **Nouv. Esthét.**, São Paulo, v. 7, n. 37, p. 26-30, 1997.

THE MERCK INDEX, 10.ed. Rahway, p.1221-1222, 1983.

THE UNITED States Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: United State Pharmacopeial Convention. 1999.

TOJO, K. Design and calibration of *in vitro* permeation apparatus. In: CHIEN, Y. W. **Transdermal Controlled Systemic Medications**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 127-158.

TORUAN-PURBA, A. V., TABIBI, E., MENDES, R. Isotretinoin liposomes whit soluble collagen as a penetration through shed snake skin. **Pharm. Res.**, Suppl., New York, v. 10, n. 10, PDD 7277, 1993.

TURAKKA, L., KONTRA, K., KYLLÖNEN, A. M. Release of hydroxybenzoic acids from a triglyceride vehicle containing surfactants. **Pharm. Acta Helv., Zurich**, v. 58, n. 5-6, p. 153-159, 1983.

TUROVELZKY, H.L. Pigmentação & despigmentação. **Nouv. Esthét.**, São Paulo, v. 2, n. 9, p. 16-18, 1992.

VIGLIOGLIA, P.A., RUBIN, J. **Cosmiatria II**. Buenos Aires: A P Americana, 1989, p.34-37; 203-213.

WESTER, R. C., MAIBACH, H. I. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations. In: BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**, New York: Marcel Dekker, 1989, p.653-659.

WESTER, R. C., MAIBACH, H. I. Relationship of topical dose and percutaneous absorption in Rhesus monkey and man. **J. Dermatol.**, New York, v. 67, n. 4, p. 518-520, 1976.

ANEXOS

**SP FARMA**

Pedido : 74150

FUND UNIV FEDERAL DO PARANA - FUMPAR

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Este é o seu Certificado de Análise SP FARMA. Com ele, você tem a garantia de que este produto está de acordo, ou excede às especificações estabelecidas pela United States Pharmacopeia ou pela British Pharmacopeia.

ACIDO KOJICO

Lote : 200091727
Origem : CHINA
Fabric. : 01/09/2000
Peso Molec : 142,11

Análise : 10/11/2000
Validade : 01/03/2002
DCB/DCI :
Form Molec : C6H6O4

Análises Realizadas pela SP Farma

Teste Realizado	Especificação	Resultado Obtido
Solubilidade	Livre solubilidade em água, etanol, levemente solúvel em acetona.	Conforme
Ponto de fusão	152 - 155°C	155°C
Perda por secagem	2,0% máximo	0,15%
Resíduo após ignição	0,1% máximo	0
Teor	98,0 - 102,0%	98,63%- HPLC

Análises Realizadas pelo Fabricante

Teste Realizado	Especificação	Resultado Obtido
Solubilidade	Livre solubilidade em água, etanol, levemente solúvel em acetona.	Conforme
Ponto de fusão	152 - 155°C	153- 154°C
Metais Pesados	20 ppm máximo	Conforme
Arsênio	2 ppm máximo	Conforme
Perda por secagem	2,0% máximo	0,2%
Resíduo após ignição	0,1% máximo	0,03%
Teor	98,0 - 102,0%	99,2%

ARMAZENAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO**MANTER EM LOCAL SECO E FRESCO**

Fator de Correção :

Cristiane B. Rombesso
Química da Qualidade

Leticia Rita Rezende
Farmacêutica Resp. CRF : 16114-SP

Data de Emissão : 11/01/2002

Mantenha este Certificado em seus arquivos para facilitar consultas eventualmente necessárias.
Informações complementares, contatar nosso Depto. Técnico pelo fone : (0XX11) 5561-6513